

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Maestría en Agroecología y Ambiente

**CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS
AUTÓCTONOS BIORREMEDIADORES DE SUELOS CONTAMINADOS POR
AGROQUÍMICOS EN LA PROVINCIA DE LOJA.**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE MAGISTER EN
AGROECOLOGÍA Y AMBIENTE**

AUTOR: Ing. Yuri Elizabeth Abad Guarnizo

DIRECTOR: Ing. Roldan Torres Gutiérrez Ph.D

CUENCA, ECUADOR

2017



RESUMEN

A pesar de la importancia de encaminar investigaciones que demuestren la nocividad de los agroquímicos a los agroecosistemas, los estudios basados en la mitigación de estos daños, especialmente mediante métodos diagnósticos y de biorremediación son muy escasos en el Ecuador. Se realizó un diagnóstico socioambiental en el cantón Pindal, para conocer las causas y consecuencias de la contaminación por agroquímicos. Conocidos los niveles de toxicidad, se aisló microorganismos autóctonos de los suelos contaminados, los cuales fueron caracterizados morfo-cultural y genéticamente, para ello se realizó la secuenciación de los genes y análisis bioinformáticos en la empresa norteamericana Sequencing Lab Macrogen Corp.

Se diseñaron experimentos totalmente aleatorizados en condiciones de laboratorio para evaluar el potencial biorremediador de aislados microbianos, mediante métodos de bio-absorción para degradar sustancias xenobióticas provenientes de agroquímicos.

Se identificaron ocho géneros de hongos con potencial biorremediador en zonas productoras de maíz convencional en el cantón Pindal (Loja): *Penicillium*, *Mucor*, *Scytalidium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Eurotiomycetes*, *Talaromyces* y *Fusarium*. **En el caso de Hongos:** *Mucor circinelloides* F., constituye el de mayor capacidad de adaptabilidad y absorción para glifosato en dosificaciones de 5g/l y 1g/l. Mientras que, *Penicillium chrysogenum* y *Uncultured Aspergillus*, constituyen los de mayor capacidad de absorción para cipermetrina; **en el caso de Bacterias:** *Bacilos rectangulares gram positivos*, tuvo un crecimiento del 59 % mayor que su testigo en dosis de 1g/l; 61% en 5g/l y 55% en 15gr/l. Mientras que medio de cultivo líquido con cipermetrina, *Micrococo gran positivo*, presenta mayor crecimiento en dosificaciones de 2 g/l y 1g/l.

Palabras clave: SUSTENTABILIDAD, AGROECOLOGÍA, AGROQUÍMICOS, BIORREMEDIACIÓN, BIO-ABSORCIÓN, MICROORGANISMOS, DEGRADACIÓN, SUSTANCIAS XENOBIÓTICAS.



ABSTRACT

Despite the importance of conducting research to demonstrate the harmfulness of agrochemicals into the agro-ecosystems, studies based on the mitigation of these damages, especially through diagnostic and bioremediation methods, are very scarce in Ecuador. A socio-environmental diagnosis was made in the Pindal canton, to know the causes and consequences of contamination by agrochemicals. Once the toxicity levels were known, autochthonous microorganisms were isolated from the contaminated soils, which were characterized morph-culturally and genetically way. Gene sequencing and bio-informatics analysis were performed by the US company Sequencing Lab Macrogen Corp.

Totally randomized experiments were designed under laboratory conditions to evaluate the bioremediation potential of microbial isolates by bio-absorption methods to degrade xenobiotic substances from agrochemicals.

Eight categories of fungus, with bioremediation potential, were identified in conventional corn producing areas in the Pindal canton (Loja): *Penicillium*, *Mucor*, *Scytalidium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Eurotiomycetes*, *Talaromyces* and *Fusarium*. In the case of: *Mucor circinelloides* F., it constitutes the one with a greater capacity of adaptability and absorption for glyphosate in dosages of 5g / l and 1g / l. While, *Penicillium chrysogenum* and Uncultured *Aspergillus*, are those for greater capacity of absorption for cipermetrina; in the case of Bacteria: rectangular bacilli positive gram, had a growth of 59% greater than in doses of 1g / l; 61% in 5g / l and 55% in 15gr / l. While in a liquid medium with cipermertrina, *Micrococo grand* positive, shows higher growth in dosages of 2 g / l and 1 g / l.

Keyword: SUSTAINABILITY, AGROECOLOGY, AGROCHEMICALS, BIOREMEDIATION, BIO-ABSORPTION, MICROORGANISMS, DEGRADE, XENOBIOTIC SUBSTANCES.



INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	12
DEDICATORIA	13
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 EL SUELO, COMO RECURSO NATURAL FUNDAMENTAL PARA LA SUSTENTABILIDAD Y SOBERANÍA ALIMENTARIA	
2.1.1 ENFOQUES DEL SUELO DESDE LA VISIÓN ANDINA Y CONVENCIONAL	17
2.1.2 MARCO LEGAL FAVORABLE PARA EL MANEJO Y CONSERVACIÓN DEL SUELO EN EL ECUADOR	17
2.1.2.1 La Constitución Política del Ecuador	17
2.1.2.2 Ley Orgánica del Régimen de Soberanía Alimentaria "LORSA"	18
2.1.2.3 Acuerdo ministerial MAE Nº 028	19
2.1.2.4 Normas de aplicación general	19
2.1.2.5 De las actividades que degradan la calidad del suelo	19
2.1.2.6 Criterios de Calidad del Suelo y Criterios de Remediación	19
2.1.2.7 Criterios de Remediación o restauración del suelo	20
2.2 ASPECTOS CONCEPTUALES	21
2.2.1 IMPORTANCIA DE LA SOSTENIBILIDAD DEL SUELO	21
2.2.2 INDICADORES GLOBALES DE LA SALUD DEL SUELO	22
2.2.2.1 Propiedades físicas del suelo	23
2.2.2.1.1 Textura	23
2.2.2.1.2 Conductividad eléctrica	24
2.2.2.2 Propiedades químicas del suelo	24
2.2.2.2.1 El pH del suelo	24
2.2.2.3 Propiedades biológicas del suelo	25
2.2.3 INFLUENCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA DESCOMPOSICIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y SUSTANCIAS XENOBIÓTICAS	26
2.3 LOS AGROQUÍMICOS COMO FUENTE DE DEGRADACIÓN DE LOS SUELOS	28
2.3.1 PRINCIPALES AGENTES CONTAMINANTES DE LOS SUELOS	28
2.3.2 EL GLIFOSATO	28
2.3.2.1 Movimiento del glifosato	29
2.3.2.2 Persistencia	29
2.3.2.3 Biodegradabilidad del glifosato	30
2.3.3 IMPACTOS DEL GLIFOSATO	30
2.3.3.1 En el sistema suelo-planta	30



2.3.3.2	En la salud humana	31
2.3.3.3	Investigaciones sobre los efectos del glifosato	32
2.4	LA BIORREMEDIACIÓN	33
2.4.1	CONCEPTO DE BIORREMEDIACIÓN	33
2.4.2	TIPOS DE BIORREMEDIACIÓN	33
2.4.2.1	Degradación enzimática	33
2.4.2.2	Remediación microbiana	34
2.4.2.3	Fitorremediación	35
2.5	ESTUDIOS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA	35
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		38
3.1	MATERIALES	38
3.1.1	MATERIALES DE CAMPO	38
3.1.2	MATERIALES DE OFICINA	38
3.1.3	EQUIPOS DE LABORATORIO	38
3.1.4	MEDIOS Y REACTIVOS	39
3.2	MÉTODOS	40
3.2.1	UBICACIÓN POLÍTICA Y GEOGRÁFICA DEL ÁREA DE ESTUDIO	40
3.2.2	VARIABLES DE ESTUDIO	41
3.2.2.1	Variable Independiente	41
3.2.2.2	Variables dependientes	41
3.2.3	HIPÓTESIS	41
3.3	DISEÑO EXPERIMENTAL	41
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
EL MODELO ESTADÍSTICO A APLICAR FUE EL <i>ONE WAY ANOVA</i> Y LA PRUEBA PARAMÉTRICA DE BONFERRONI QUE NOS PERMITIÓ COMPARAR LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES.		42
3.4.1	METODOLOGÍA PARA EL PRIMER OBJETIVO	42
3.4.1.1	Selección del sitio para toma de muestra	42
3.4.1.2	Aplicación de encuestas	42
3.4.1.3	Toma de la muestra	43
3.4.1.4	Etiquetado	43
3.4.1.5	Análisis de laboratorio	44
3.4.2	METODOLOGÍA PARA EL SEGUNDO OBJETIVO	44
3.4.2.1	Diluciones seriadas cuantitativas	45
3.4.2.2	Siembra en cajas Petri, cuantificación y diversidad de colonias bacterianas	45
3.4.2.3	Análisis morfo-cultural de los aislados bacterianos	46
3.4.2.4	Tinción de Gram	47
3.4.2.5	Tinción de hongos	48
3.4.2.6	Aislamiento de ADN	50
3.4.2.6.1	Aislamiento de ADN de Bacterias	50
3.4.2.6.2	Aislamiento de ADN hongos	51
3.4.2.6.3	Extracción de ADN de Hongos	51



3.4.2.6.4 Amplificación de genes conservados en genomas de microorganismos procariotas y eucariotas 52

3.4.3 METODOLOGÍA PARA EL TERCER OBJETIVO	53
3.4.3.1 Métodos de Bio-absorción	53
3.4.3.1.1 Biodegradación de hongos con la aplicación (glifosato y Cipermetrina) en cultivos sólidos y líquidos	53
3.4.3.1.1.1 Ensayo de hongos con Glifosato	54
3.4.3.1.1.2 Ensayo de hongos con Cipermetrina	61
3.4.3.1.2 Biodegradación bacteriana de plaguicidas (glifosato y Cipermetrina) por microorganismos autóctonos en medio de cultivo líquido.	64

CAPÍTULO IV: RESULTADOS 67

4.1 RESULTADO PARA EL PRIMER OBJETIVO	67
4.1.1 SELECCIÓN DEL LUGAR DEL MUESTREO	67
4.1.2 ENCUESTAS APLICADAS EN LA ZONA DE INTERVENCIÓN	69
4.1.3 PARÁMETROS FÍSICOS	79
4.1.3.1 Clase textural	80
4.1.3.2 pH	80
4.1.3.3 Parámetros Químicos	80
4.1.3.4 Materia Orgánica	80
4.1.3.5 Fósforo	81
4.1.3.6 Potasio	81
4.1.3.7 Conductividad Eléctrica	81
4.2 RESULTADO DEL SEGUNDO OBJETIVO ESPECÍFICO	81
4.2.1 ANÁLISIS MORFO-CULTURAL	82
4.2.1.1 Conteo Colonias de bacterias	82
4.2.1.2 Conteo de Colonias de hongos	82
4.2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOCULTURAL	83
4.3 RESULTADO PARA EL TERCER OBJETIVO	91
4.3.1 MÉTODOS DE BIO-ABSORCION	91
4.3.1.1 Biodegradación de hongos con la aplicación de plaguicidas (glifosato y Cipermetrina) en cultivos sólidos y líquidos.	91
4.3.1.1.1 Ensayo de hongos con Glifosato	91
4.3.1.1.2 Ensayo de hongos con Cipermetrina	95
4.3.1.2 Biodegradación bacteriana con la aplicación de plaguicidas (glifosato y Cipermetrina) en medio de cultivo líquido.	98
4.3.1.2.1 Ensayo crecimiento de bacterias en medio liquido con Glifosato	98
4.3.1.2.2 Ensayo Crecimiento de bacterias en medio liquido con Cipermetrina	100

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN 102

5.1 RESULTADOS DEL PRIMER OBJETIVO ESPECÍFICO	102
5.2 PARA LOS RESULTADOS DEL SEGUNDO OBJETIVO ESPECIFICO	104



5.2.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE BACTERIAS	104
5.3 PARA LOS RESULTADOS DEL TERCER OBJETIVO ESPECIFICO	105
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	107
6.1 CONCLUSIONES	107
6.2 RECOMENDACIONES	109
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	110
7 ANEXOS	116

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de calidad de suelo	20
Tabla 2. Criterios de Remediación (Valores Máximos Permitidos)	20
Tabla 3. Servicios ambientales que presenta el suelo	22
Tabla 4. Controversias de Monsanto y hallazgos de Investigadores independientes	32
Tabla 5. Datos de la etiqueta	44
Tabla 6. Crecimiento radial de hongos en las diferentes concertaciones de Glifosato	58
Tabla 7. Crecimiento radial de hongos en las diferentes concertaciones de Cipermetrina	62
Tabla 8. Ubicación geográfica del sector muestreado	67
Tabla 9. Resultados de encuestas aplicadas en la zona de intervención	69
Tabla 10. Evaluación de parámetros físicos en las muestras de suelos obtenidas del Cantón Pindal	79
Tabla 11. Evaluación de parámetros químicos en las muestras de suelos obtenidas de las fincas del cantón Pindal	80
Tabla 12. Caracterización morfocultural de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos de las fincas del cantón Pindal	83
Tabla 13. Caracterización morfocultural de las colonias de hongos obtenidas de los aislamientos de las muestras de suelo	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación geográfica del cantón Pindal	40
Figura 2. Características morfológicas para el análisis morfo-cultural de las bacterias	47
Figura 3. Mapa de las zonas de muestreo del Cantón Pindal	68
Figura 4. Principales cultivos que se siembran en el cantón	71
Figura 5. Aplicación de prácticas de rotación de cultivos	71
Figura 6. Cultivo principal en el cantón	72
Figura 7. Alteraciones al suelo: a) Importante pérdida de cobertura vegetal, b) Clara inestabilidad de talud, c) Evidencia de erosión antropogénica, d) Evidencia de erosión natural y e) Mínima intervención del suelo.	72
Figura 8. Alteraciones a las aguas: a) Importante alteraciones de fuentes y drenajes superficiales, b) Generación de vertidos, c) Contaminación por materia orgánica de drenajes menores, d) Desviación del curso de fuentes y drenajes menores (riachuelos)	73



Figura 9. Alteraciones al aire: a) Generación de olores a sustancias químicas, b) Emisión de gases, c) Generación de ruidos, d) Generación de partículas y polvos.	74
Figura 10. Aplicación de agroquímicos en fincas maiceras	74
Figura 11. Aplicación de fertilizantes químicos en las fincas maiceras	75
Figura 12. Fertilización química en fincas maiceras	75
Figura 13. Uso de medios de protección para la aplicación de agroquímicos	76
Figura 14. Aplicación de fertilizantes orgánicos o biofertilizantes	76
Figura 15. Aplicación de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades	77
Figura 16. Tipo de agroquímicos aplicados para el control de plagas y enfermedades	77
Figura 17. Aplicación de productos biológicos para el control de plagas y enfermedades	78
Figura 18. Productores maiceros del cantón conocen los efectos negativos de la aplicación de agroquímicos	78
Figura 19. Problemas de salud en la zona maicera	79
Figura 20. Cuantificación de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo en muestras procedentes de las fincas seleccionadas del cantón Pindal (UFC g suelo-1). Letras desiguales en las columnas difieren para $P < 0.05$ por Bonferroni. Error Estandar: 25.5. Ver datos estadísticos en anexo 3.	82
Figura 21. Cuantificación de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo en muestras procedentes de las fincas seleccionadas del cantón Pindal (UFC g suelo-1). Letras desiguales en las columnas difieren para $P < 0.05$ por Bonferroni. Error Estandar: 25.5. Ver datos estadísticos en anexo 4.	83
Figura 22. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 1g/l	91
Figura 23. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 5g/l	92
Figura 24. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 15g/l	93
Figura 25. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 1g/l	93
Figura 26. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 5g/l	94
Figura 27. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados a concentración de 5g/l	95
Figura 28. Inhibición del crecimiento de hongos producida por Cipermetrina en aislados a concentración de 1g/l	95
Figura 29. Inhibición del crecimiento de hongos producida por Cipermetrina en aislados a concentración de 2g/l.	96
Figura 30. Inhibición del crecimiento de hongos producida por Cipermetrina en aislados, a concentración de 1g/l.	97
Figura 31. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 2g/l	97
Figura 32. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en las concentraciones: 0 mg ml ⁻¹ Glifosato, 1 mg ml ⁻¹ Gl, 5 mg ml ⁻¹ Gl y 15 mg ml ⁻¹ Gl	98
Figura 33. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en la concentración de 1g/l-1 Gl	99
Figura 34. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en la concentración de 5 mg ml ⁻¹ Gl	99
Figura 35. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en la concentración de 15 mg ml ⁻¹ Gl	100
Figura 36. Inhibición del crecimiento bacteriano producido por Cipermetrina en aislados a concentración de 1g/l	100
Figura 37. Inhibición del crecimiento de bacterias producida por Cipermetrina en aislados a concentración de 2g/l	101



LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1. Recolección de muestras _____	43
Fotografía 2. Muestra de suelo etiquetada _____	44
Fotografía 3. Cuantificación de las comunidades bacterianas _____	46
Fotografía 4. Muestra de hongo _____	48
Fotografía 5. Esterilización de portaobjetos _____	48
Fotografía 6. Aplicación de azul de lacto fenol _____	49
Fotografía 7. Muestra de tejido hifal _____	49
Fotografía 8. Muestras preparadas _____	49
Fotografía 9. Observación de muestras _____	50
Fotografía 10. Proceso de maceración de hongos para extracción de ADN _____	51
Fotografía 11. Cepas de hongos seleccionados para el ensayo _____	54
Fotografía 12. Preparación del medio de cultivo _____	55
Fotografía 13. Preparación del medio de cultivo _____	55
Fotografía 14. Esterilización del medio de cultivo _____	56
Fotografía 15. Incorporación del glifosato en el medio de cultivo _____	56
Fotografía 16. Medios de cultivo con glifosato y sin glifosato _____	57
Fotografía 17. Siembra de las cepas de hongos _____	57
Fotografía 18. Toma de datos del crecimiento radial _____	58
Fotografía 19. Siembra de hongos para el ensayo con glifosato _____	60
Fotografía 20. Proceso pesaje de hongos _____	60
Fotografía 21. Incorporación de Cipermetrina en el medio de cultivo _____	61
Fotografía 22. Bacterias seleccionadas para el ensayo _____	64
Fotografía 23. Siembra de bacterias con glifosato y Cipermetrina _____	65
Fotografía 24. Ensayo de bacterias y hongos sometidos a espectrofotometría _____	66



Yo, Yuri Elizabeth Abad Guarnizo, autora de la tesis “**CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS BIORREMEDIADORES DE SUELOS CONTAMINADOS POR AGROQUÍMICOS EN LA PROVINCIA DE LOJA**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **MAGISTER EN AGROECOLOGÍA Y AMBIENTE**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 10 de marzo de 2017.

Yuri Elizabeth Abad Guarnizo

C.I. 1104483993



Yuri Elizabeth Abad Guarnizo autora de la tesis **“CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS BIORREMEDIADORES DE SUELOS CONTAMINADOS POR AGROQUÍMICOS EN LA PROVINCIA DE LOJA”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 10 de marzo de 2017.

Yuri Elizabeth Abad Guarnizo

C.I. 1104483993



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme guiado, dado fortaleza y bendecirme a cada momento y permitirme cumplir exitosamente con esta meta tan importante para mi vida personal y profesional, además agradezco a mi madre Gladis Guarnizo, a mi padre Melecio Abad, a mi hermana Viviana Abad, mis hermanos Jonathan Abad y Julio César, quiénes me han apoyado siempre y con sus sabios consejos me han dado luz para seguir siempre adelante.

Un agradecimiento especial a Osmani López, quien me ha guiado en el transcurso de esta importante investigación.

Finalmente expreso mi más sincero reconocimiento y agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, a través del Centro de Biotecnología, en lo personal al Ing. Roldán Torres Gutiérrez Ph.D, en calidad de Director de Tesis, por su acertado y responsable aporte investigativo para culminar con éxito la presente investigación.

Yuri Elizabeth Abad Guarnizo



DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación quiero dedicarle a Dios que me ha dado la vida y que día a día me ha colmado de sus bendiciones, dándome mucha valentía y fe para luchar contra las adversidades y llegar a cumplir con esfuerzo, dignidad, humildad y satisfacción esta meta importante para mi vida personal y profesional; a mis padres que me han formado con buenos principios y valores haciendo de mí una gran mujer, gracias a su importante apoyo, consejos, comprensión y amor; a mi hermana y hermanos que siempre me han motivado para salir adelante; y, finalmente a todos mis familiares y amigos/as que a lo largo del camino han estado conmigo transmitiéndome energías positivas para continuar.

Yuri Elizabeth Abad Guarnizo



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La Constitución de la República del Ecuador, en su Artículo 281, determina que “La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiados de forma permanente”. Además, explicita en el Artículo 411: ...“Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil, para lo que se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión”. (Asamblea Nacional Constituyente, 2008).

Estos referentes legales no se plasman de forma aleatoria o arbitraria en la Carta Magna del Ecuador, sino que van dirigido a preservar uno de los recursos más valiosos de la biosfera, el cual es el sustento de todo proceso en las cadenas tróficas: el suelo (Hartemink, 2016). Este recurso casi no renovable, debe gestionarse con sumo cuidado a fin de evitar riesgos de contaminación intrínsecos y, de este modo, velar por la calidad de la salud pública (Ministerio del Ambiente, 2012). El suelo no puede verse como un ente aislado e inerte, ya que es la base de los procesos agrícolas sostenibles a nivel global y, por ende, el soporte para lograr la seguridad alimentaria, especialmente en países en vías de desarrollo (Magdoff y Van Es, 2009).

Cerca del 25% de la población económicamente activa del Ecuador depende del sector primario (agricultura, ganadería, pesca y silvicultura) para su sustento (ENEMDU, 2015). La superficie por uso y labor agropecuaria en el país en el año 2015 pone de manifiesto que alrededor del 56% de los suelos están bajo la influencia de la acción antropogénica para la producción de bienes a partir del sector agrícola (INEC, 2015). De este porcentaje, el 16.76% perteneció a cultivos transitorios y barbechos, siendo el maíz seco (*Zea mays* L.) el que más repercutió en el aporte del sector al Producto Interno Bruto (PIB) (INEC, 2015; Monteros y Salvador, 2015).



El maíz (*Zea mays* L.) es un alimento básico para la población ecuatoriana. Este grano cuenta con una superficie cultivable de 339,946 ha y producción de 1,536,508 Tm (INEC, 2015). Dentro de las provincias más destacadas en su cultivo se encuentra Loja, considerada como la capital maicera del Sur del Ecuador. El cultivo de este cereal en la provincia se encuentra establecido en monocultivos, con utilización de semillas híbridas en su mayoría, totalmente dependientes de insumos químicos, cuyos suelos luego de su aplicación quedan expensas a la contaminación, pudiendo ocasionar daños en los componentes químicos, físicos y biológicos de estos, así como en los mantos acuíferos.

Las consecuencias del uso irracional de agroquímicos van desde el deterioro ambiental, hasta daños en la salud humana (Kniss y Cobun, 2015). Dentro de los perjuicios más notables se encuentra la proliferación de enfermedades tales como: cáncer, alteraciones genéticas, intoxicaciones, esterilidad y provocar la muerte; hasta la aparición de plagas y enfermedades más resistentes. El efecto fundamental sobre los suelos se enmarca en el incremento continuo de la salinidad, erosión y el agotamiento de la fertilidad; trayendo consigo la disminución de la productividad agrícola (Ramón y Rodas, 2007). Es por ello que se hace imperante la búsqueda de métodos que logren minimizar, no solo la aplicación de estos productos nocivos en los procesos agrícolas, sino que aquellos que ya son aplicados, se logren degradar rápidamente para reducir su impacto sobre componentes bióticos y abióticos del medioambiente, surgiendo así la biorremediación.

La biorremediación es una rama de la biología, basada en la utilización de microorganismos, plantas o enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural (Umrana, 2006). El beneficio de su aplicación se pone de manifiesto en la contribución de los agentes biológicos al saneamiento de las aguas y suelos. (Jerez, 2009).

A pesar de la importancia de encaminar investigaciones que demuestren la nocividad de la aplicación irracional de agroquímicos, tanto a los ecosistemas como a las comunidades rurales donde estos se aplican, los estudios basados en la



mitigación de estos daños, especialmente mediante métodos diagnósticos y de biorremediación son muy escasos o inexistentes en el Ecuador. Es por ello que los aportes prácticos del presente proyecto de investigación, están dados en la identificación de microorganismos con alto potencial biorremediador para la disminución y/o eliminación de contaminantes provenientes de agroquímicos y el efecto causado por estos agentes biológicos a la producción agrícola. Estos aportes, ya sea teóricos como prácticos, contribuyen fehacientemente al desarrollo sustentable de la región y el país.

Los objetivos del presente proyecto de investigación fueron los siguientes:

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la biorremediación de suelos contaminados por agroquímicos en la provincia de Loja, a través de la caracterización, identificación molecular y evaluación del potencial biorremediador de microorganismos autóctonos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diagnosticar los factores socio-ambientales en áreas productoras de maíz de la provincia de Loja bajo régimen intensivo de aplicación de agroquímicos.
2. Caracterizar e identificar morfocultural y molecularmente microorganismos autóctonos con potencial biorremediador de sustancias xenobióticas provenientes de agroquímicos en la zona de estudio.
3. Evaluar el potencial biorremediador de aislados microbianos, basado en métodos de bio-absorción para degradar las principales sustancias xenobióticas identificadas en el diagnóstico.



CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El suelo, como recurso natural fundamental para la sustentabilidad y soberanía alimentaria

2.1.1 Enfoques del suelo desde la visión andina y convencional

En el mundo andino, el suelo es considerado como un organismo vivo, porque en él se alojan millones de microorganismos que hacen que el suelo sea fértil y muy saludable. Por esta razón, el suelo no puede ser visto como un simple soporte de plantas, así como tampoco utilizar una fórmula universal para cultivarlo y fertilizarlo, es decir, aplicar en los suelos tropicales las técnicas agrícolas utilizadas en los suelos de las regiones templadas. Para que el suelo conserve su vida hay que saberlo manejar y así él permitirá que nazcan plantas sanas y fuertes, resistentes al ataque de plagas y enfermedades (PRATEC, 1994, Párr. 1-2).

2.1.2 Marco legal favorable para el manejo y conservación del suelo en el Ecuador

2.1.2.1 La Constitución Política del Ecuador

Art.409 “Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

Art.410 “El Estado brindará a los agricultores y a las comunidades rurales apoyo para la conservación y restauración de los suelos, así como para el desarrollo de prácticas agrícolas que los protejan y promuevan la soberanía alimentaria”. (Asamblea Nacional Constituyente, 2008, p. 38).



2.1.2.2 Ley Orgánica del Régimen de Soberanía Alimentaria “LORSA”

Artículo 1. Finalidad.- Esta Ley tiene por objeto establecer los mecanismos mediante los cuales el Estado cumpla con su obligación y objetivo estratégico de garantizar a las personas, comunidades y pueblos la autosuficiencia de alimentos sanos, nutritivos y culturalmente apropiados de forma permanente.

El régimen de la soberanía alimentaria se constituye por el conjunto de normas conexas, destinadas a establecer en forma soberana las políticas públicas agroalimentarias para fomentar la producción suficiente y la adecuada conservación, intercambio, transformación, comercialización y consumo de alimentos sanos, nutritivos, preferentemente provenientes de la pequeña, la micro, pequeña y mediana producción campesina, de las organizaciones económicas populares y de la pesca artesanal así como microempresa y artesanía; respetando y protegiendo la agrobiodiversidad, los conocimientos y formas de producción tradicionales y ancestrales, bajo los principios de equidad, solidaridad, inclusión, sustentabilidad social y ambiental.

Artículo 9. Investigación y extensión para la soberanía alimentaria

El Estado asegurará y desarrollará la investigación científica y tecnológica en materia agroalimentaria, que tendrá por objeto mejorar la calidad nutricional de los alimentos, la productividad, la sanidad alimentaria, así como proteger y enriquecer la agrobiodiversidad.

Además, asegurará la investigación aplicada y participativa y la creación de un sistema de extensión, que transferirá la tecnología generada en la investigación, a fin de proporcionar una asistencia técnica, sustentada en un diálogo e intercambio de saberes con los pequeños y medianos productores, valorando el conocimiento de mujeres y hombres (Asamblea Nacional Constituyente, 2010, p. 38).



2.1.2.3 Acuerdo ministerial MAE N° 028

El Acuerdo Ministerial No. 028; (2015), en sus siguientes literales establece:

2.1.2.4 Normas de aplicación general

Para la prevención y control de la contaminación del suelo se establece los siguientes criterios:

Utilizar sistemas de agricultura que no degraden, contaminen o desequilibren el ecosistema del área geográfica en que se desenvuelvan; esto incluye el uso racional y técnico de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. En aquellos suelos que presentan contaminación, deberán llevarse a cabo las acciones necesarias para recuperarlos, restaurarlos o restablecer las condiciones iniciales existentes anteriormente a la ejecución de un determinado proyecto. (p. 113)

2.1.2.5 De las actividades que degradan la calidad del suelo

Las personas naturales o jurídicas públicas o privadas dedicadas a la comercialización, almacenamiento y/o producción de químicos, hidroelectricidad, exploración y explotación hidrocarburífera, minera, florícola, pecuaria, agrícola u otros, tomarán todas las medidas pertinentes a fin de que el uso de su materia prima, insumos y/o descargas provenientes de sus sistemas de producción, comercialización y/o tratamiento, no causen daños físicos, químicos o biológicos a los suelos. (p. 114)

2.1.2.6 Criterios de Calidad del Suelo y Criterios de Remediación

Los criterios de calidad del suelo son valores de fondo aproximados o límites analíticos de detección para un contaminante presente en el suelo. Los cuáles se refieren a los niveles ambientales representativos para un contaminante



en el suelo. Estos resultados pueden ser el resultado de la evolución natural de área, a partir de sus características geológicas, sin influencia de actividades antropogénicas. Los criterios de calidad del suelo se describen a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de calidad de suelo

SUSTANCIA	UNIDADES (CONCENTRACIÓN EN PESO SECO)	SUELO
Parámetros Generales		
Conductividad	uS/m	200
Ph		6 a 8
Relación de Adsorción de Sodio (Índice SAR)		4*

Fuente: Ministerio del Ambiente. Acuerdo Ministerial N° 028. 2015. Ec

2.1.2.7 Criterios de Remediación o restauración del suelo

Los criterios de Remediación o Restauración se establecen de acuerdo al uso que del suelo, tienen el propósito de establecer los niveles máximos de concentración de contaminantes en un suelo luego de un proceso de remediación, y son presentados continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios de Remediación (Valores Máximos Permitidos)

Tabla 21. Criterios de Remediación (Valores Máximos Permitidos)					
SUSTANCIA	Unidades	USO DEL SUELO			
		Residencial	Comercial	Industrial	Agrícola
Parámetros Generales					
Conductividad	uS/mm	200	400	400	200
Ph	-	6 a 8	6 a 8	6 a 8	6 a 8
Pesticidas organoclorados					
DDT	mg/Kg	0,1	0,1	0,1	0,1
Endosulfan I	mg/Kg	0,1	0,1	0,1	0,1

Fuente: Ministerio del Ambiente. Acuerdo Ministerial N° 028. 2015 Ec



2.2 Aspectos conceptuales

El suelo es un componente central de los recursos de tierras para el desarrollo agrícola y la sostenibilidad ecológica. El suelo es la base para obtener alimentos, piensos, combustible y producción de fibras y muchos servicios ecológicos vitales. El suelo es un sistema vivo complejo, dinámico y su idoneidad varía de un lugar a otro. El área de tierra productiva es limitada y se encuentra bajo una creciente presión por la intensificación y los usos que compiten por los cultivos agrícolas, bosques y pastos/pastizales, y para satisfacer las demandas de una creciente población de alimentos y producción de energía, extracción de materias primas, y demás. (FAO, 2015).

En la normativa legal vigente establecida por la Autoridad Ambiental Nacional, en el Acuerdo Ministerial 028, se considera el suelo como la capa superior de la corteza terrestre, situada entre el lecho rocoso y la superficie, compuesto por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos y que constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso (MAE, 2015, p. 13).

2.2.1 Importancia de la sostenibilidad del suelo

Desde el punto de vista de la sostenibilidad, el suelo debe entenderse como un recurso y un ente vivo que regula no solo el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que también tiene gran importancia en muchos procesos biológicos de los seres vivos. El suelo es un medio muy frágil que es preciso cuidar para asegurar su sostenibilidad a largo plazo (Ramón, 2007. p 36).

Silva y Correa (2009) mencionan que:

El suelo desempeña una serie de funciones, medioambientales, sociales y económicas, que resultan fundamentales para la vida, como es el caso de la materia orgánica que tiene un valor fundamental para su sostenimiento ya que



proveen diversas funciones y servicios ambientales importantes para el ser humano. (p. 16, 17).

A continuación, se presenta la siguiente tabla de servicios ambientales que presenta el recurso suelo.

Tabla 3. Servicios ambientales que presenta el suelo

Servicios Ambientales	Descripción
Generación de alimentos y producción de biomasa	Los alimentos y otros productos agrícolas, esenciales para la vida humana: vegetación-pastos, cultivos y árboles, etc.
Almacenaje, filtración y transformación	Almacena minerales, materia orgánica, agua. Sirve de filtro natural de las aguas subterráneas, la principal reserva de agua potable, libera dióxido de carbono, metano y otros gases de la atmosfera.
Hábitat y reserva genética	Es el hábitat de una variedad de organismos que viven tanto en el suelo como sobre él. Esta es una función ecológica esencial.
Entorno físico y cultura para la humanidad	Sirve de base a las actividades humanas, es un elemento del paisaje y del patrimonio cultura.
Fuente de materia primas	Proporciona materias primas tales como: las arcillas, arenas y minerales, que son empleados en los diversos procesos productivos de las organizaciones.

Fuente: Silva y Correa, 2009

2.2.2 Indicadores Globales de la salud del suelo

FAO (2015), establece que:

La medición de la calidad del suelo es un ejercicio de identificación de las propiedades del suelo que son sensibles al manejo, que se afectan o se correlacionan con los resultados ambientales, y son capaces de ser medidos con precisión dentro de ciertas limitaciones técnicas y económicas. Existen tres categorías principales de indicadores del suelo: químicas, físicas y biológicas.



El carbono en el suelo, trasciende las tres categorías de indicadores y tiene la influencia más ampliamente reconocida en la calidad del suelo ya que está vinculado a todas sus funciones.

2.2.2.1 Propiedades físicas del suelo

Las propiedades físicas del suelo permiten determinar en gran medida los diferentes usos que se le pueden dar, el estado físico del suelo determina la rigidez, la facilidad de penetración de las raíces, la porosidad, la compactación, la capacidad de drenaje y retención de agua. Las propiedades físicas del suelo influyen directamente en el crecimiento de las plantas y son un factor limitante para ciertos cultivos. (Porta y Acevedo 2003).

Las propiedades físicas más importantes son: textura, densidad aparente y estructura, definen la capacidad de infiltración y almacenamiento de agua y contribuyen a definir su estabilidad y capacidad de uso. (Porta y Acevedo 2003).

2.2.2.1.1 Textura

El portal web de Perú ecológico, (2012) describe que: La textura depende de la proporción de partículas minerales de diverso tamaño presentes en el suelo. Las partículas minerales se clasifican por tamaño en cuatro grupos:

- ✓ Fragmentos rocosos: diámetro superior a 2 mm, y son piedras, grava y cascajo.
- ✓ Arena: diámetro entre 0,05 a 2 mm. Puede ser gruesa, fina y muy fina. Los granos de arena son ásperos al tacto y no forman agregados estables, porque conservan su individualidad.
- ✓ Limo: diámetro entre 0,002 y 0,5 mm. Al tacto es como la harina o el talco, y tiene alta capacidad de retención de agua.



- ✓ Arcilla: diámetro inferior a 0,002 mm. Al ser humedecida es plástica y pegajosa; cuando seca forma terrones duros.

2.2.2.1.2 Conductividad eléctrica

USAD, (2009) articula que: El análisis del suelo en cuanto a sales es necesario no sólo para registrar los posibles aumentos en campos de regadío, sino también ayuda a determinar si el riego se debe intentar en primer lugar. La salinidad se mide mediante el análisis de conductividad eléctrica (CE) en unidades como por ejemplo; deciSiemens por metro (dS/m)., las siguientes denominaciones se utilizan para las diferentes concentraciones de sales en el suelo. pp. 5.

2.2.2.2 Propiedades químicas del suelo

La roca madre la cual sufre procesos de meteorización es la que forma el suelo y determina su composición química inicial, luego intervienen fenómenos vinculados principalmente al agua, los cuales producen que componentes como cloruros, sulfatos, calcio, sodio o potasio formen lixiviados y sean transportados a otras capas del suelo, este fenómeno hace que las concentraciones de estos elementos varíen y puedan provocar que otras propiedades químicas como pH o conductividad eléctrica sean alteradas. (Porta y Acevedo 2003).

Las propiedades químicas más importantes son la capacidad de intercambio catiónico, el grado de acidez o alcalinidad y la concentración de sales y nutrientes en el perfil, la conductividad eléctrica, el potencial de hidrogeno, entre otros (Porta y Acevedo 2003).

2.2.2.2.1 El pH del suelo

El pH de suelo: los líquidos o fluidos tienen en consideración la cantidad de hidrógeno libre existente en una solución, dependiendo de una determinada situación química, teniendo esto en cuenta existe acidez, neutralidad o alcalinidad. La reacción química del suelo se expresa en valores pH, es decir el volumen de



iones de hidrógeno no neutralizados que contiene. El valor neutro (sin reacción) es 7; por su parte, un suelo cuyo pH este por encima de 7 tendrá una reacción alcalina, si por el contrario es inferior a 7 será acida (Gujarro, et al, 2002, p 39).

El valor del pH en el suelo oscila entre 3,5 (muy ácido) a 9,5 (muy alcalino). Los suelos muy ácidos (<5,5) tienden presentar cantidades elevadas y tóxicas de aluminio y manganeso. Los suelos muy alcalinos (>8,5) tienden a dispersarse. La actividad de los organismos del suelo es inhibida en suelos muy ácidos y para los cultivos agrícolas el valor del pH ideal se encuentra en 6,5. (FAO, 2016).

2.2.2.3 Propiedades biológicas del suelo

Las propiedades biológicas del suelo están asociadas a la cantidad de materia orgánica, como restos de plantas o animales en descomposición, y de formas de vida presentes, tales como microorganismos, lombrices e invertebrados, los mismos que interactúan y participan en diversos ciclos de los nutrientes, en ciertos casos los seres vivos ayudan a transformar a los nutrientes en productos que puedan ser asimilados por las plantas, por ejemplo el género de microorganismos *Rizobium* fija el nitrógeno del aire y permite que las plantas lo aprovechen. Estos elementos contribuyen a definir la capacidad de uso y erodabilidad del suelo (Alexander, 1991).

Los principales microorganismos degradadores de bacterias son: *Achrornobacter*, *Arthrobacter*, *Erwinia*, *Moraxella*, *Sarcina*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Xanthomyces*, *Sperotihlus*, *Actinomyces*, *Beneckea*, *Klebsiella*, *Nocardia*, *Spirillum*, *Aeromonas*, *Brevebacterium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Streptomyces*, *Alcaligenes*, *Coryneforms*, *Leumthrix*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.

En cuanto a hongos los principales microorganismos son los siguientes: *Allescheria*, *Debaromyces*, *Phialophora*, *Torulopsis*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Gonytrichum*, *Rhodosporidium*, *Trichosporon*, *Botrytis*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Helminthosporium*, *Saccharomyces*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Saccharomycopsis*, *Cladosporium*,



Oidiodendrum, *Scopulariopsis*, *Cunninghamella*, *Paecylomyces* y *Sporobolomyces*. (Nieto et al, 2014).

El suelo contiene básicamente cinco grupos de microorganismos: bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios. Como ecosistema, el suelo incluye además a los constituyentes orgánicos e inorgánicos propios de un determinado lugar (Alexander 1980).

Alguna de las actividades desarrolladas por los microorganismos del suelo son: disponibilidad de nutrientes (fijación biológica del nitrógeno), control biológico (control de enfermedades de las plantas), biodegradación de plaguicidas y contaminantes (reducción de metales tóxicos a menos tóxicos, utilización de plaguicidas como fuente de nutrientes), formación de agregados (humus). (Arboleda y Bravo, 2008 p. 32).

2.2.3 Influencia de los microorganismos en la descomposición de materia orgánica y sustancias xenobióticas

Los microorganismos degradadores necesitan de diferentes factores para su óptimo crecimiento, se enlistan a continuación:

1. Nutrimientos y oxígeno: Las bacterias heterotróficas para crecer necesitan una fuente de carbono, otros nutrimentos y un aceptor final de electrones, el cual es el oxígeno para el caso de las aerobias. Las bacterias llegan a necesitar micronutrimentos en concentraciones traza y algunos factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas u otras moléculas orgánicas.
2. Humedad del suelo: Los microorganismos, igual que todos los organismos, necesitan humedad para crecer, ya que se componen por más de un 80% de agua. Por lo tanto, es importante mantener el contenido de humedad a un nivel adecuado, que de acuerdo a varios autores, es de 50 a 80%.



3. pH del suelo: La acidez o alcalinidad de una solución afecta el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de las bacterias crecen de manera óptima, en un rango de 6.5 a 7.5, aunque hay excepciones.
4. Temperatura: La temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias aisladas del suelo es entre 20 y 25°C. (Ortiz *et al.*, 1997).

Castrejón, (s.f.), en su estudio de caracterización e identificación de consorcios bacterianos capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados, determino que:

El consorcio bacteriano aislado de suelos agrícolas está compuesto por 11 bacterias, seis con capacidad de crecer en presencia de Paratión metílico y cinco para agroquímicos. Las especies identificadas son: *Bacillus brevis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Weeksella virosa*, *Flavobacterium odoratum*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*. La cepa identificada como *Bacillus brevis* resultó con mayor capacidad de crecimiento en un medio mínimo con paratión metílico como única fuente de carbono y en medio líquido. *Burkholderia cepacia* es una bacteria con capacidad de crecer en medio líquido con agroquímicos; se ha reportado para la recuperación de suelos contaminados con residuos tóxicos.

Existen en el mercado productos comerciales, ensayados en el laboratorio, que reúnen microorganismos con gran potencial biodegradador. Sin embargo, la reintroducción de microorganismos indígenas, aislados del sitio contaminado y cultivados posteriormente, es más efectiva, especialmente cuando se acompañan de un suplemento nutricional y oxígeno (Korda *et al.*, 1997).

En este sentido, el estudio de la contaminación por sustancias xenobióticas en suelos asociado a los sistemas intensivos de producción agrícola se ha convertido en un área de investigación que ha tenido gran desarrollo en las últimas décadas por los nefastos impactos de estas sustancias al medio edáfico, a través de diversas fuentes orgánicas y químicas utilizadas en las diferentes prácticas agronómicas a los cultivos (Rueda y Molina, 2011).



2.3 Los agroquímicos como fuente de degradación de los suelos

Para la Comunidad Andina, (2011), “la salud de los individuos y las comunidades no puede ser separada de la salud de los ecosistemas, pues suelos saludables producen cultivos saludables que fomentan la salud de los animales y las personas” (p.6).

Los plaguicidas están diseñados para matar, reducir o repeler los insectos, hierbas, roedores, hongos y otros organismos que puedan amenazar la salud pública y las economías de las naciones. Cuando estos productos químicos se manejan o depositan inadecuadamente pueden afectar la salud humana (Childhood, 2004).

2.3.1 Principales agentes contaminantes de los suelos

Debido a los agroquímicos perecen muchas especies de microbios, de bacterias fijadoras de nitrógeno del aire, de hongos micorrizas que asociados a las plantas, multiplican en 200 veces la absorción de nutrientes de la raíz. Al suelo degradado debe regársele caldos de microbios conseguidos en los suelos vivos. Sin microbios sería imposible la vida en el planeta (Forero, 2014, p 5).

2.3.2 El Glifosato

El glifosato es un herbicida no selectivo, de post emergencia, ampliamente utilizado para el control de malas hierbas, introducido por Monsanto en la década de los 70, es posiblemente el herbicida más utilizado en la actualidad en todo el planeta. Una vez aplicado el glifosato, es fuertemente absorbido por los componentes del suelo, tales como arcillas, óxidos de hierro y ácido húmicos. (Camino y Aparicio, 2010. p. 10).

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP- Ecuador (como se citó en Cordero y Sanchez, s.f), sostiene que el uso del glifosato está dirigido al combate de malezas anuales y perennes de hoja angosta y ancha en áreas cultivadas y no cultivadas.



Para este propósito el INIAP recomienda el uso del glifosato en áreas agrícolas considerando aplicaciones dirigidas con pantalla en cultivos perennes y totales sobre áreas no cultivadas. La dosis que se recomienda aplicar varía de 2 a 4 litros de producto comercial por hectárea, considerando dosis menores para especies anuales y mayores para especies perennes.

2.3.2.1 Movimiento del glifosato

Doublet et al., (como se citó en Salazar y Aldana, 2011), determinó que el glifosato tiene la capacidad de translocarse del tejido vegetal (raíz) hacia el suelo e incrementa la persistencia de dos a seis veces en suelos en los que pudiesen existir restos de plantas a los que previamente se aplicó el herbicida.

Bott, et al., (como se citó en Salazar y Aldana, 2011), sustenta que el glifosato una vez en el suelo puede removilizarse por competencia con el fósforo, lo cual podría representar una ruta de transferencia adicional del herbicida hacia plantas no consideradas (blanco u objetivo), esto estará fuertemente influenciado por las características del suelo (fósforo, hierro, pH, CIC, contenido de arena y materia orgánica del suelo. (p. 23, 24).

Según Ruiz (como se citó en Rosas, 2012) establece que: En un suelo de bosque húmedo tropical secundario de Sucumbíos - Ecuador, a los dos días de haber aplicado glifosato en el suelo fue detectado en el sustrato de 0 a 5 cm, concluyendo que quedó retenido en el primer sustrato y que no fue movilizado por infiltración.

2.3.2.2 Persistencia

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (como se citó en Rosas, 2012) reporta que: La vida media del glifosato en el suelo puede ser hasta 60 días y que los residuos de campo se encuentran al año siguiente. En vegetales cuando la planta muere el glifosato está presente en los tejidos, disipándose el 50% de los desechos en un tiempo de 8 a 9 días. (p. 14).



A su vez en una investigación realizada por Gaón (como se citó en Rosas, 2012), en arboles de cacao roseados con glifosato, determinó que en los tejidos de cultivo el glifosato fue degradado en un tiempo de 180 días bajo condiciones tropicales de la Amazonia. (p. 16)

2.3.2.3 Biodegradabilidad del glifosato

Según Dong-Mei et al., (como se cita en Bozzo, 2010) menciona que “los impactos del glifosato en los organismos parecen ser insignificantes porque el glifosato es rápidamente adsorbido a las partículas del suelo donde su actividad es limitada mientras que el glifosato libre es rápidamente degradado por los microorganismos” (p. 21).

Los microorganismos exhiben dos estrategias diferentes: 1) catabolismo en el herbicida adsorbido es degradado en moléculas menores generando energía, y 2) el metabolismo, en el cual el pesticida es transformado por reacciones metabólicas pero no sirve como fuente de energía para los microorganismos; por lo tanto es necesario un sustrato secundario biodegradable como fuente de carbono y energía. (Bozzo, 2010. p. 30)

2.3.3 Impactos del glifosato

2.3.3.1 En el sistema suelo-planta

Riley et al. (2011) afirma que: El glifosato ingresa al suelo a través de las raíces de las plantas que han sido rociadas o de la vegetación muerta. Es importante destacar que el glifosato afecta a la rizosfera generando impactos en sus funciones, estos incluyen:

- Reducción en la absorción de micronutrientes esenciales para los cultivos.
- Reducción en la fijación de nitrógeno, resultando en una disminución de los rendimientos.



- Incremento en la vulnerabilidad hacia enfermedades de plantas.

Tales cambios tienen un impacto directo en la salud y el rendimiento de los cultivos, provocados por la intervención del glifosato en la biología y química del suelo.

La disminución de la biomasa microbiana del suelo puede ser un buen indicador de la pérdida de calidad del suelo y a largo plazo pueden predecir tendencias en el contenido total de materia orgánica. Los efectos de los contaminantes pueden ser directos, ocasionado la muerte de los microorganismos o disminuyendo el aprovechamiento del sustrato, resultando en la disminución de la biomasa microbiana.” (p.6).

2.3.3.2 En la salud humana

Los efectos crónicos vinculados al glifosato y sus productos derivados pueden ser clasificados en las siguientes categorías:

Reproductivas: Varios casos de malformaciones, en conjunto con repetidos abortos espontáneos. Las malformaciones congénitas incluyeron microcefalia (cabeza pequeña) anencefalia y malformaciones craneales. (Paganelli et al, como se citó en Riley, Cotter, Contiero, y Watts, 2011. p. 13)

Cancerígenas: Otoño como se citó en Riley, et. al, (2011) mencionan que: Existe el aumento significativo en el cáncer y en particular el cáncer infantil, incluyendo leucemia, linfoma y tumores cerebrales. Una serie de estudios de laboratorio han demostrado que el glifosato, es genotóxico o mutagénico en células humanas, incluyendo las hepáticas y los linfocitos. (p. 15)

Neurológicos: Axelrad (como se citó en Riley, et. al, 2011) determinan que:

El glifosato puede afectar el sistema nervioso e incluso puede estar implicado en enfermedades neurodegenerativas como el mal de Parkinson. El glifosato resulta inhibidor del crecimiento de las prolongaciones neuronales, a concentraciones inferiores a las medidas en plasma y tejidos en agricultores expuestos. (p. 16).



Algunos de los efectos agudos más comúnmente informados por las exposiciones a glifosato son aquellos de la piel, ojos, respiratorios, gastrointestinales y cardíacos. (Riley, et. al, 2011 p. 17).

2.3.3.3 Investigaciones sobre los efectos del glifosato

Gallo e Iñiguez (2010) sustentan que “un equipo norteamericano de científicos independiente, Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides (NCAP) ha realizado una revisión de la toxicología del glifosato e identificado efectos adversos en todas las categorías de estudios toxicológicos (subcrónicos, crónicos, cancerígenos, mutagénicos y reproductivos)” (p. 43)

En la siguiente tabla se evidencia la sistematización de los expertos en controversia con las aseveraciones de Monsanto y los hallazgos de Investigadores Independientes.

Tabla 4. Controversias de Monsanto y hallazgos de Investigadores independientes

Aseveraciones de Monsanto	Hallazgos de Investigadores Independientes
El Roundup posee un bajo potencial irritativo para ojos y la piel y además no constituye un riesgo para la salud humana.	El Roundup está entre los pesticidas más denunciados por ocasionar incidentes de envenenamiento en diversos países. El Roundup ocasiona un espectro de síntomas agudos, incluyendo eczema recurrente, problemas respiratorios, hipertensión arterial y reacciones alérgicas.
El Roundup no ocasiona ningún efecto adverso reproductivo	En ensayos de laboratorios sobre conejos el glifosato produce efectos dañinos duraderos sobre la calidad del esperma.
El Roundup no es mutagénico en mamíferos	En el experimento de laboratorio se observó daño en el ADN de órganos y tejidos de ratones.
El Roundup es ambientalmente seguro	En el medio ambiente agrícola, el glifosato es toxico para organismos benéficos del suelo y artrópodos predadores, e incrementa la susceptibilidad a enfermedades de los cultivos. El uso de glifosato en forestación y agricultura genera efectos indirectos perjudiciales en pájaros y pequeños mamíferos al dañar su provisión alimenticia y su hábitat. Dosis sub-letales de glifosato provenientes de la derivan dañan las comunidades de plantas silvestres y pueden afectar algunas especies situadas hasta 20 metros del fumigador.



<p>El Roundup es rápidamente inactivo en el suelo y el agua.</p>	<p>El glifosato es muy persistente en el suelo y los sedimentos.</p> <p>Residuos de glifosato fueron hallados en lechuga, zanahoria y cebada cuando fueron plantados un año después de la aplicación de glifosato.</p> <p>Los fertilizantes en base a fosfatos pueden inhibir la degradación del glifosato en el suelo.</p>
<p>El Roundup es inmóvil y no percola en los suelos</p>	<p>El glifosato puede separarse fácilmente de las partículas del suelo en un amplio espectro de tipos de suelos. Puede ser extensivamente móvil y percolar hacia capas más profundas.</p>

Fuente: (Gallo e Iñiguez , 2010. p. 44, 45)

2.4 La Biorremediación

2.4.1 Concepto de biorremediación

La biorremediación utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes, y, por tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas (Glazer y Nikaido, 1995). Su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia (Atlas y Unterman, 1999). La biorremediación es una rama de la biología basada en la utilización de microorganismos, plantas o enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural (Umrانيا, 2006). El beneficio de su aplicación se pone de manifiesto en la contribución de los agentes biológicos al saneamiento de las aguas y a revertir la fertilidad de los suelos. Todo ello con un gran y beneficioso impacto medioambiental, social y económico (Jerez, 2009).

2.4.2 Tipos de biorremediación

2.4.2.1 Degradación enzimática



Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen en cantidades industriales por bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por las empresas biotecnológicas.

Por ejemplo, existe un amplio número de industrias de procesamiento de alimentos que producen residuos que necesariamente deben ser posteriormente tratados.

En estos casos, se aplican grupos de enzimas que hidrolizan polímeros complejos para luego terminar de degradarlos con el uso de microorganismos. Un ejemplo lo constituyen las enzimas lipasas que se usan junto a cultivos bacterianos para eliminar los depósitos de grasa procedentes de las paredes de las tuberías que transportan los efluentes.

Otras enzimas que hidrolizan polímeros utilizados de forma similar son las celulasas, proteinasas y amilasas, que degradan celulosa, proteínas y almidón, respectivamente. Además de hidrolizar estos polímeros, existen enzimas capaces de degradar compuestos altamente tóxicos. Estas enzimas son utilizadas en tratamientos en donde los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes.

Por ejemplo, se emplea la enzima peroxidasa para iniciar la degradación de fenoles y aminas aromáticas presentes en aguas residuales de muchas industrias. (BIOETICA, 2015).

2.4.2.2 Remediación microbiana

En este tipo de remediación se usan microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Los microorganismos utilizados en biorremediación pueden ser los ya existentes (autóctonos) en el sitio



contaminado o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser agregados o inoculados.

La descontaminación se produce debido a la capacidad natural que tienen ciertos organismos de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas.

El ser humano ha aprendido a aprovechar estos procesos metabólicos de los microorganismos, que pueden degradar compuestos tóxicos para el ambiente y convertirlos en compuestos inocuos o menos tóxicos, se aprovechan en el proceso de biorremediación.

Existen, por ejemplo, bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas, éteres, alcoholes simples, entre otros. (BIOETICA, 2015).

2.4.2.3 Fitorremediación

La fitorremediación es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos. La fitorremediación ofrece algunas ventajas y desventajas frente a los otros tipos de biorremediación (BIOETICA, 2015).

2.5 Estudios de la diversidad microbiana

Galli (como se cita en Torres, 2003), señala que “los compuestos tóxicos más usados son los plaguicidas, los cuales en muchos casos resultan ser muy peligrosos. Estos compuestos químicos constituyen una adecuada fuente de carbono y donadores de electrones para ciertos microorganismos del suelo”. En la



literatura existen algunos ejemplos de degradación de plaguicidas por microorganismos, entre los cuales se pueden citar los siguientes.

Según Golovleva *et al* (como se cita en Torres, 2003), “*Pseudomonas*, son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica”. Vásquez y Reyes (2002) evaluaron tres especies de *Pseudomonas* para la biodegradación del herbicida Aroclor 1242. Los resultados obtenidos demuestran la gran capacidad de las bacterias para degradarlo, siendo el porcentaje de degradación de 99.8, 89.4 y 98.4, respectivamente.

Ouahiba *et al* (como se cita en Torres, 2003), “aisló varias especies de hongos en suelos contaminados con pesticidas de Argelia. Las especies más frecuentes fueron *Aspergillus fumigatus*, *A. Níger*, *A. terreus*, *Absidia corymberifera* y *Rhizopus microsporus var microsporis*. En este experimento, 53 especies aisladas destacaron por su habilidad para la degradación del herbicida metribuzin en medio líquido. Se demostró a su vez que el herbicida promovía el crecimiento de los géneros *Absidia* y *Fusarium*, los cuales lograron eliminar el 50% del compuesto después de 5 días. Por otra parte, la especie *Botrytis cinerea* eliminó el herbicida linuron casi completamente, y 31 especies pudieron eliminar el metroburon, destacando *Botrytis Cinerea* que lo eliminó casi en su totalidad”.

Otro experimento mostró la eficiencia de la bacteria *Rhodococcus* sp. para degradar las triazinas a nitrato. Fournier *et al.* (2002), realizó un ensayo para estudiar las transformaciones del herbicida atrazina como consecuencia de la descomposición microbiana.

Este compuesto logró ser transformado en nitrito (30%), óxido nitroso (3,2%), amonio (10%) y formaldehído (27%).

Existen en el mercado productos comerciales, ensayados en el laboratorio, que reúnen microorganismos con gran potencial biodegradador. Sin embargo, la



reintroducción de microorganismos indígenas, aislados del sitio contaminado y cultivados posteriormente, es más efectiva, especialmente cuando se acompañan de un suplemento nutricional y oxígeno (Korda *et al.*, 1997).

Shushkova *et al.*, (como se cita en Martínez *et al.* 2012), “utilizando la bacteria *Ochrobactum anthropi* GPK3, redujo la concentración de glifosato en un 25,4%, en un suelo con un contenido del 1 % de carbono orgánico y 39 % de arcilla”.



CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales de campo

Los materiales de campo más destacados fueron los que se enuncian:

- ✓ Gps
- ✓ Fundas Ziplog
- ✓ Barreta
- ✓ Pala
- ✓ Cámara Fotográfica

3.1.2 Materiales de oficina

- ✓ Computador
- ✓ Impresora
- ✓ Internet
- ✓ Lápiz cristalográfico
- ✓ Libreta de registro
- ✓ Calculadora

3.1.3 Equipos de laboratorio

- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Tubos de cultivo
- ✓ Cámara de dispersión
- ✓ Contador de bacterias
- ✓ Incubadora
- ✓ Cajas petri
- ✓ Balanza eléctrica
- ✓ Pipetas serológicas



- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Asa de siembra
- ✓ Cubeta de tinción
- ✓ Porta y cubre objetos
- ✓ Papel de absorción
- ✓ Microscopio
- ✓ Vasos de precipitación
- ✓ Mechero de alcohol
- ✓ Papel Aluminio
- ✓ Conclave
- ✓ Gotero
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarilla
- ✓ Mechero Fisher
- ✓ Matraz Erlenmeyer
- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Picetas
- ✓ Balanzas analíticas
- ✓ Mortero
- ✓ Embudo
- ✓ Microscopio

3.1.4 Medios y reactivos

- ✓ Alcohol
- ✓ Manitol
- ✓ Enatol
- ✓ Agua Oxigenada
- ✓ Cristal violeta
- ✓ Safranina
- ✓ Caldo Nutriente
- ✓ Agua destilada
- ✓ Agar MacConKey

- ✓ Agar Kingler
- ✓ Agar Nutritivo

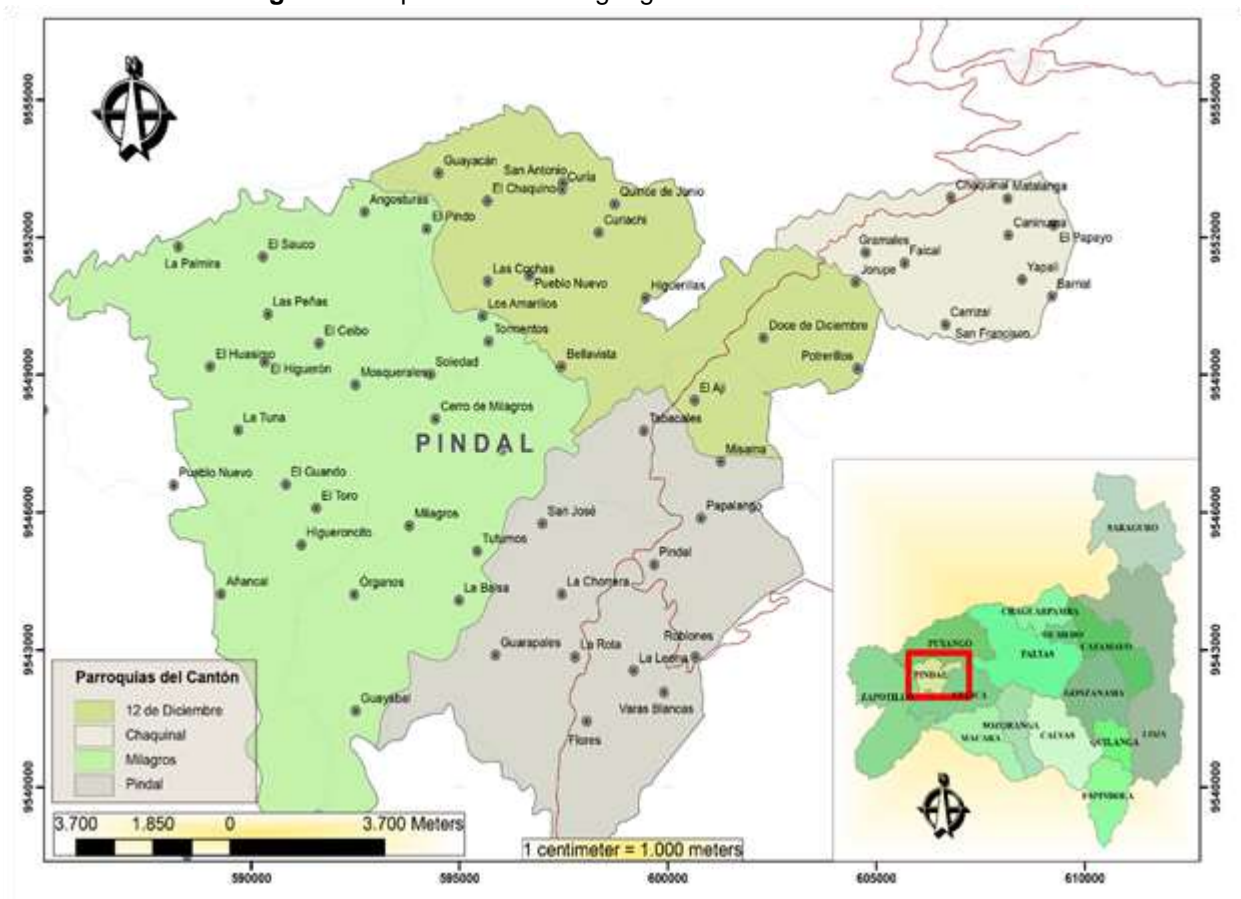
3.2 Métodos

3.2.1 Ubicación política y geográfica del área de estudio

La recolección de muestras de suelo, se realizó en 12 fincas de productores maiceros del cantón Pindal, catalogado como la “capital maicera del Ecuador”, el cual se encuentra ubicado al Sur-Oeste de la provincia del Loja. Partiendo desde la ciudad de Loja hasta el centro Cantonal existe una distancia aproximada 217 Km.

Por otra parte las pruebas de laboratorio se están realizando, en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Figura 1. Mapa de ubicación geográfica del cantón Pindal



Fuente: (Autora, 2016)



3.2.2 Variables de estudio

3.2.2.1 Variable Independiente

Cantidad, variabilidad y bioabsorción de sustancias xenobióticas por los microorganismos en estudio.

3.2.2.2 Variables dependientes

Sustancias xenobioticas evaluadas.

3.2.3 Hipótesis

En suelos altamente contaminados por agroquímicos en cultivos de maíz (*Zea mays*) de la provincia de Loja, se identifican importantes cepas de microorganismos (hongos y bacterias) autóctonos con elevado potencial biorremediador de sustancias xenobióticas.

3.3 Diseño Experimental

Para la fase de recolección de muestras en la zona de estudio se aplicó un diseño al azar y en la fase de laboratorio se utilizó un diseño completamente al azar con 10 réplicas por tratamiento evaluado.

- ✓ ENFOQUE: CUANTITATIVO
- ✓ ALCANCE: CORRELACIONAL

3.4 Análisis estadístico

Se aplicó un ensayo estadístico a los resultados obtenidos, para lo cual se utilizó el paquete estadístico *STATGRAPHICS CENTURION* v 14. En todos los casos se analizaron la normalidad de los datos obtenidos.



El modelo estadístico a aplicar fue el *One Way ANOVA* y la prueba paramétrica de Bonferroni que nos permitió comparar las diferentes concentraciones.

3.4.1 Metodología para el primer objetivo

“Diagnosticar los factores socio-ambientales en áreas productoras de maíz de la provincia de Loja bajo régimen intensivo de aplicación de agroquímicos”

3.4.1.1 Selección del sitio para toma de muestra

El sitio para la toma de muestras se seleccionó, tomando en consideración los siguientes criterios:

- Zonas de alta utilización de agro químicos
- Zonas de mayor producción de maíz (*Zea mays*)
- Fincas de productores ubicadas en los tres pisos altitudinales

De cada finca se hizo la captura de información espacial para construir el mapa de la zona de intervención, utilizando el Sistema de Posicionamiento Geográfico (GPS) con la información dada por el sistema de coordenadas UTM, datum WGS 84, permitió el diseño de geo-database y mapas que se elaboraron en el programa ArcGis 9.3.

3.4.1.2 Aplicación de encuestas

Con la finalidad de obtener información referente al uso de agroquímicos y sus repercusiones, se procedió a aplicar encuestas en la zona de estudio para determinar: cantidad de productos aplicados, periodicidad de aplicación, condiciones para la aplicación, modo de aplicación, efectos causados a los suelos, agua y agricultores, síntomas visibles de proliferación de enfermedades asociadas al uso de agroquímicos, uso de medios protectores para la aplicación, cuantificación de las proporciones de agroquímicos en suelos.

La información obtenida de las encuestas se sistematizó, aplicando pruebas no paramétricas (Prueba del CHI-CUADRADO).

Es importante mencionar que este análisis se realizó en función de la percepción de los/as productores/as, por lo cual no se realizaron mediciones in situ.

3.4.1.3 Toma de la muestra

Posterior a la selección del sitio, se procedió a recolectar doce muestras de suelo en una cantidad de 2 Kg y a una profundidad de 30 cm (Sabroso y Pastor, 2004), este proceso de desarrollo con todas las medidas asépticas, las cuáles fueron guardadas en bolsas ziplog.



Fotografía 1. Recolección de muestras

3.4.1.4 Etiquetado

Las muestras fueron enviadas al Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, con el fin de hacer los análisis físicos, químicos y microbiológicos, para lo cual se realizaron las respectivas etiquetas con los siguientes datos:

Tabla 5. Datos de la etiqueta

NUMERO DE MUESTRA	
MUESTREADO POR:	Fecha
	Hora
	Coordenadas
UBICACIÓN	Cantidad
	Hora del muestreo:

Fuente: (Autora, 2015)

**Fotografía 2.** Muestra de suelo etiquetada

3.4.1.5 Análisis de laboratorio

De las muestras recolectas, se envió 800 gramos al Laboratorio de Análisis Físico- Químico de Suelos, Aguas y Bromatología del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, el cual se encargó del análisis de los siguientes parámetros: textura, pH, Materia Orgánica (MO), Fósforo y Potasio.

3.4.2 Metodología para el segundo objetivo

Caracterizar e identificar morfo cultural y molecularmente microorganismos autóctonos con potencial biorremediador de sustancias xenobióticas provenientes de agroquímicos en la zona de estudio.



3.4.2.1 Diluciones seriadas cuantitativas

Con la finalidad de cuantificar el número de microorganismos por gramo de suelo y obtener los aislados bacterianos con diferentes características morfo-culturales, se procedió a realizar las respectivas diluciones seriadas cuantitativas. Las diluciones se realizaron desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , para lo cual se usó de tubos de ensayo de 40 ml estériles que contenían 9 ml de agua destilada, donde se adicionó 1 g de suelo, las cuales se constituyeron subsiguientemente en las diferentes diluciones cuantitativas.

3.4.2.2 Siembra en cajas Petri, cuantificación y diversidad de colonias bacterianas

Contando con las diluciones, se procedió a la siembra de las mismas en cajas Petri, tomando las concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} para cultivos de hongos, mientras que para cultivos de bacterias se tomaron de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , esto fue de acuerdo a la metodología propuesta por Torres-Gutiérrez (2008), donde considera como estándares para la determinación de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo.

Para la siembra de las diluciones se preparó el medio de cultivo general Agar nutriente, empleado para el crecimiento de cualquier organismo procariota. La cantidad de medio a elaborar se lo hizo de acuerdo a la cantidad de muestras y número de cajas, considerando que por cada dilución se realizó cuatro réplicas. El medio se preparó a razón de 28 g por cada 1000 ml de agua, según el fabricante.

Luego del proceso antes mencionado, se procedió a realizar la siembra, para lo cual se tomó de cada dilución 1 ml y de manera uniforme se depositó en las cajas Petri con ayuda de micropipetas, al finalizar se incorporó el medio de cultivo en una relación de 20 ml por caja aproximadamente, seguidamente se cubrió con la tapa y se hizo movimientos en dirección a los 4 cuadrantes con la finalidad de conseguir un crecimiento homogéneo puntiforme de las colonias.

Finalmente, las cajas Petri con cada dilución fueron colocadas en las incubadoras a 30 °C, para bacterias y 28 °C para hongos y a las 24, 72 y 96 horas se realizó la cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y la determinación de la diversidad bacteriana por el análisis de parámetros morfo-culturales.



Fotografía 3. Cuantificación de las comunidades bacterianas

La cuantificación de las colonias bacterianas para las muestras de suelo se realizó mediante la siguiente formula:

$$UFC = \frac{\left(\frac{\sum N^{\circ}pm}{N^{\circ}C} \right)}{V} * FD$$

Dónde:

UFC: Unidades formadoras de colonias

$\sum N^{\circ}pm$: Sumatoria del número probable de microorganismo por cada caja Petri

$N^{\circ}C$: número de cajas Petri

V: Volumen inoculado en la caja Petri

F.D: Factor de dilución

3.4.2.3 Análisis morfo-cultural de los aislados bacterianos

El análisis morfo-cultural consistió en la determinación de apariencia de crecimiento que presenta las colonias, el color, la forma, elevación, bordes y la tinción de Gram de cada uno de los aislados Triviño (2011).

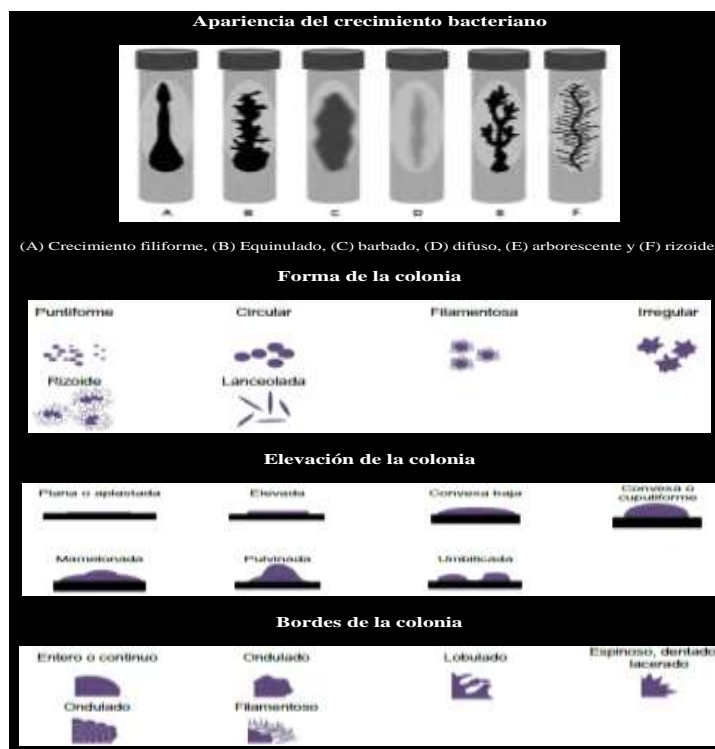


Figura 2. Características morfológicas para el análisis morfo-cultural de las bacterias

Fuente: (Schlegel, 1993)

3.4.2.4 Tinción de Gram

Luego de sembradas las bacterias a las 24 horas, se procedió a realizar la Tinción de Gram, para lo cual se inició con el frotis colocando una gota de agua destilada sobre un portaobjetos y luego con la ayuda del asa microbiológica se tomó una pequeña cantidad del cultivo bacteriano. El cultivo fue extendido a lo largo del portaobjeto, luego se deja secar y finalmente se fijó la preparación pasándola muy levemente por la llama del mechero.

Teniendo el frotis seco, se añadió la violeta de cristal y se esperó 1 minuto, para proceder a lavar la preparación con agua destilada, seguidamente se añadió Lugol y se esperó 1 minutos para proceder a decantar el Lugol, para realizar el lavado con alcohol potable y luego agua destilada. Finalmente se añadió la Safranina, se esperó 1 minuto para volver a lavar con agua destilada y se dejar secar a temperatura ambiente.



Finalizado el procedimiento de tinción de Gram, se procedió a la identificación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, la forma de agrupación y la estructura de las células, con ayuda del microscopio, para lo cual se colocó el portaobjetos con la tinción.

3.4.2.5 Tinción de hongos

Para la descripción de los hongos mediante la observación microscópica de sus estructuras, se realizó una tinción o coloración, siendo el procedimiento el siguiente:

1. Se utilizó muestras preparadas en medio sólido con agar rosa bengala, incubadas de 5 a 7 días.



Fotografía 4. Muestra de hongo

2. Para prevenir la contaminación de las muestras se trabajó en la cámara, en donde se esteriliza los portaobjetos mediante el flameado.



Fotografía 5. Esterilización de portaobjetos

3. En la lámina de portaobjetos previamente esterilizada, colocamos una gota de azul de lacto fenol.



Fotografía 6. Aplicación de azul de lacto fenol

4. Con una punta tomamos una pequeña muestra del tejido hifal y la dispersamos con ayuda de otra punta.



Fotografía 7. Muestra de tejido hifal

5. Se cubre la muestra con el cubreobjetos tratando de que no queden burbujas de aire, caso contrario lo que se observara será mayoritariamente las burbujas.



Fotografía 8. Muestras preparadas

6. Se coloca la muestra en el microscopio y se procede a observar



Fotografía 9. Observación de muestras

3.4.2.6 Aislamiento de ADN

3.4.2.6.1 Aislamiento de ADN de Bacterias

Para el aislamiento del ADN de las colonias, se utilizó el protocolo de extracción de DNA genómico (Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit), considerando las instrucciones del fabricante y posteriormente analizando en el Nanodrop a fin de cuantificar y realizar la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (1,05 g de agarosa, 150 ml de buffer TBE-1X) a 115 V durante 45 minutos.

Antes de realizar el aislamiento del ADN de la bacteria primeramente se procedió adicionando el contenido RNasa A al buffer de resuspensión, luego se mezcló y se marcó el frasco. Luego en el tubo eppendorf se adicionó 10 µl de lisozima fresca con 100 µl de buffer de resuspensión con RNasa A para cada muestra.

El aislamiento del ADN de las colonias se realizó mediante el protocolo de extracción de DNA genómico utilizando el Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y analizándolo posteriormente en Nanodrop para su cuantificación y en electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (1,05 g de agarosa, 150 ml de buffer TBE-1X) a 115 V durante 45 minutos.

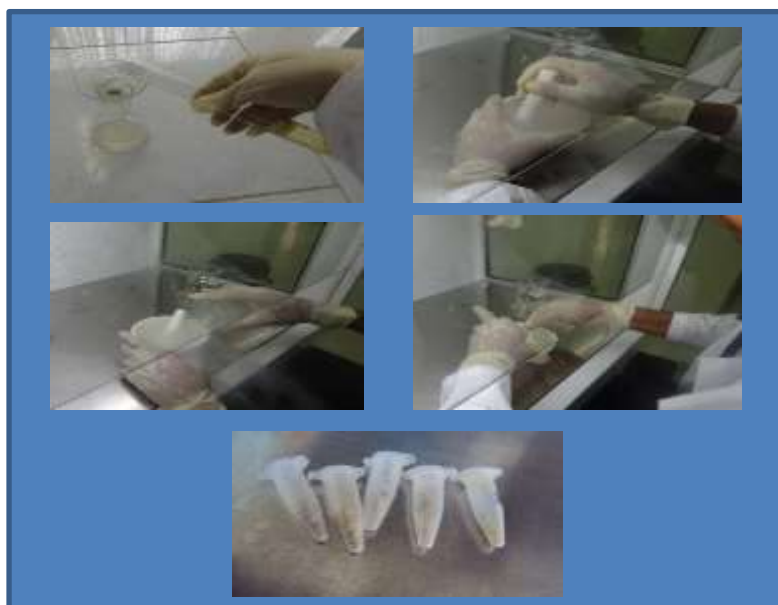
El producto de la amplificación de los genes 16S ARNr se purificó usando el kit de purificación PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit,

considerando las instrucciones del fabricante y analizado posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

3.4.2.6.2 Aislamiento de ADN hongos

Para aislar el ADN de hongos se realizó el macerado, en la cámara de bioseguridad.

En un matraz se colocó un embudo al cual se le incorporó gasa esterilizada y se procedió a extraer el hongo cultivado en medio líquido, con la ayuda de la microespátula se presionó para eliminar el líquido y se dejó únicamente el hongo, luego se lo ubicó en un mortero esterilizado y se le añadió nitrógeno líquido para su trituración. El hongo triturado se colocó en un tubo eppendorf y se refrigeró a una temperatura de -86°C .



Fotografía 10. Proceso de maceración de hongos para extracción de ADN

3.4.2.6.3 Extracción de ADN de Hongos

La extracción de ADN para bacterias se realizó utilizando el kit de extracción Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit; mientras que para hongos se utilizó el kit Purelink Genomic Plant DNA Purification Kit, ambos de Invitrogen, Inc. (USA), manipulándose en base a las instrucciones de los fabricantes.



Posteriormente de la extracción se cuantificó el ADN, mediante espectrofotometría UV/VIS (Nanodrop, USA) y en electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (1,05 g de agarosa, 150 ml de buffer TBE-1X) a 115 V durante 45 minutos.

3.4.2.6.4 Amplificación de genes conservados en genomas de microorganismos procariotas y eucariotas

Para la amplificación de los genes 16S rRNA en bacterias se siguió la metodología propuesta por Vanparys et al. (2007), con la utilización de los cebadores universales 5'CTGGCTCAGGAC/TGAACGCTG3' (ARI C/T) y 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' (pH), los cuales amplifican prácticamente la totalidad de los genes 16S rRNA. Cada reacción de amplificación (50 µl) contenían: 34µl agua MilliQ; 5 µl dNTPs (2 mM de cada uno); 5 µl 10X-buffer de PCR [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01%(w/v) gelatina]; 1,5µl de cada cebador (50 ngµl⁻¹); 1,8µl de MgCl₂; 0,2µl Taq DNA polimerasa (1 U µl⁻¹) y 1µl de la muestra de ADN extraído de las bacterias.

Las secuencias de ciclos de temperaturas que se implementaron para la amplificación de los genes fueron: un ciclo de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN, 30 ciclos de amplificación (45 segundos a 94°C, 2 minutos a 57°C y 1 minuto a 72°C), y finalmente 5 minutos a 7°C para la extensión final de los cebadores. Los productos del PCR se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (1 g de agarosa, 150 ml de buffer TAE-1X) a 115 V durante 45 minutos.

Para hongos se utilizaron los cebadores universales ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Bruns y Gardes, 1993). La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo: 35 µl de agua MiliQ, 5 µl de dNTPs (2 mM de cada uno: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 5 µl de buffer de PCR 10X, 1 µl de cada uno de los cebadores (ITS1 e ITS4), 1.8 µl de MgCl₂, 0.2 µl de Taq ADN Polimerasa (Platimun) y 1 µl de ADN extraído. En la reacción se adicionó un control para determinar si existió contaminación o no en las muestras de ADN.



Los ciclos para la amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 94°C durante 85s, seguido de 35 ciclos de amplificación de desnaturalización, hibridación y extensión (95°C por 35s, 55°C por 55 s y 72°C por 45s). Adicionalmente una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Todos los productos de PCR se chequearon mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (1 g agarosa en 100 ml buffer TBE 1x), con una intensidad de 100V durante 45 minutos.

En ambos casos, bacterias y hongos, los productos de PCR se observaron en el fotodocumentador ENDURO™ GDS TOUCH (Labnet, USA) para la confirmación de la presencia de la expresión de los genes.

La secuenciación y el análisis bioinformático se realizó con la subcontratación de los servicios de la empresa Macrogen USA, para lo cual se enviaron las muestras amplificadas de los fragmentos de genes 16S rRNA e ITS. Esta es una de las empresas más prestigiosas a nivel internacional, encargada de purificar, secuenciación y realizar análisis bioinformáticos de muestras de biología molecular.

Aunque se realizó el análisis bioinformático en esta empresa, las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron en la base de datos GeneBank, con el programa BLASTn del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1990), para la búsqueda de secuencias homologas y la identificación de los aislados obtenidos.

3.4.3 Metodología para el tercer objetivo

Evaluar el potencial biorremediador de aislados microbianos, basado en métodos de bio-absorción para degradar las principales sustancias xenobióticas identificadas en el diagnóstico.

3.4.3.1 Métodos de Bio-absorción

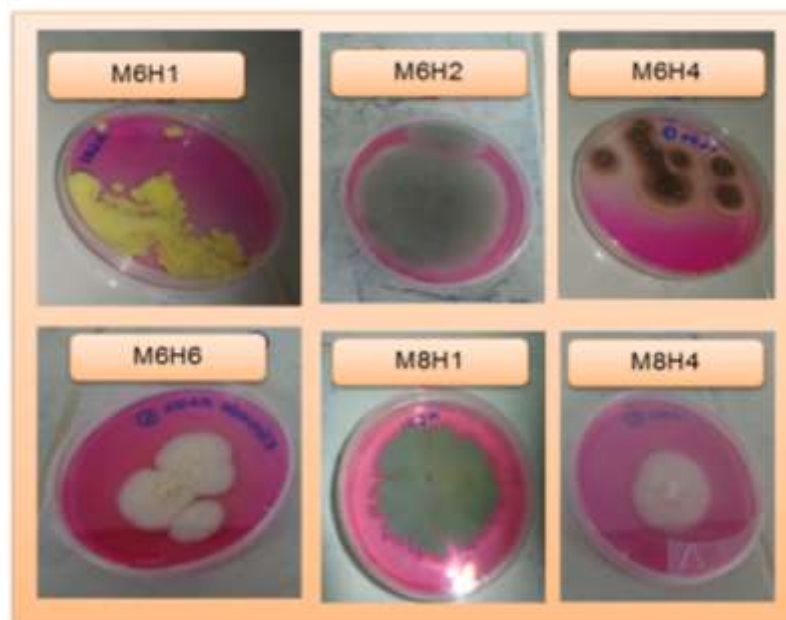
3.4.3.1.1 Biodegradación de hongos con la aplicación (glifosato y Cipermetrina) en cultivos sólidos y líquidos

3.4.3.1.1.1 Ensayo de hongos con Glifosato

El aislamiento de los hongos se lo realizó en medio de cultivo sólido y líquido, haciendo 3 réplicas de las 6 cepas de hongos seleccionados, lo que representa la incubación de 18 cepas a las cuáles se les incorporo diferentes dosis (1g/l, 5g/l y 15g/l) de glifosato, además se aislaron 18 cepas que sirvieron como el testigo del ensayo, dando un total de 36 aislados.

Se determinó el crecimiento radial de los aislados en medio sólido, en un lapso de 3 días y en el caso del peso de los hongos en medio líquido se lo realizó a los 7 días de incubación.

Para realizar el ensayo se escogieron 6 cepas de hongos (M6H1, M6H2, M6H4, M6H6, M8H1 y M8H4), mismas que fueron incubadas por siete días.



Fotografía 11. Cepas de hongos seleccionados para el ensayo

✓ Aislados en medio Solido

Se preparó medio de cultivo sólido utilizando agar nutriente rosa para ello se pesó 11,52 g del producto tomando en consideración la dosis dada en el envase del producto la cual es de 32g/l.



Fotografía 12. Preparación del medio de cultivo

Se colocó en dos vasos de Erlenmeyer el agar y se adicionó 360 ml de agua destilada, se llevó la solución a la placa calefactora a 400 rpm y a 250 °C hasta que llegue al punto de ebullición.



Fotografía 13. Preparación del medio de cultivo

Se selló los vasos de Erlenmeyer con un tapón de algodón, se los cubrió con papel aluminio y se llevó a esterilizar en autoclave.



Fotografía 14. Esterilización del medio de cultivo

La siembra se la realizó en la cámara de bioseguridad, al medio cultivo se le incorporó 360 micro litros de glifosato para la dosis de 1g/l; 1800 micro litros (5g/l) y 3900 micro litros para la dosis de 15ml/l.



Fotografía 15. Incorporación del glifosato en el medio de cultivo

Se colocó el medio de cultivo que contiene glifosato en 18 cajas Petri, y se incorporó el medio que no contiene glifosato en 18 cajas Petri y se espera hasta que el medio se solidifique, finalmente se cubrió las cajas para iniciar con la siembra.



Fotografía 16. Medios de cultivo con glifosato y sin glifosato

Para la siembra se esterilizó el sacabocados, se sacó 6 discos de cada una de las 6 cepas de hongos seleccionados, mismas que se colocaron en las cajas y se añadió el medio de cultivo con glifosato, además se ubicaron las cepas en las cajas que no contiene el producto. Para prevenir contaminación se selló las cajas con parafilm y se las ubicó en la incubadora a 27.9°C durante 8 días.



Fotografía 17. Siembra de las cepas de hongos

A los 3 días de haber incubado las cepas de hongos en las tres concentraciones de glifosato se procedió a medir el crecimiento radial durante 5 días consecutivos, con la finalidad de conocer en cuál de las concentraciones se desarrolló mejor el hongo.



Fotografía 18. Toma de datos del crecimiento radial

Tabla 6. Crecimiento radial de hongos en las diferentes concertaciones de Glifosato

CRECIMIENTO RADIAL DE HONGOS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIFOSATO		
Dosis 1g/l	Dosis 5g/l	Dosis/15g/l



Fuente: (Autora, 2015)

✓ Aislados en Medio líquido

Se preparó medio de cultivo líquido utilizando Potato Dextrosa en una cantidad de 11,52 g del producto, tomando en consideración la dosis dada en el envase (23 g/litro).

Se colocó en una gradilla 36 tubos de ensayo previamente esterilizados, a los cuáles se les adicionó 20ml de la solución, posteriormente se cubrió cada tubo con un tapón de algodón, y se sellaron los tubos con papel aluminio a fin de esterilizarlos en el autoclave.

La siembra se la realizó en la cámara de bioseguridad, a cada tubo de ensayo se le incorporó 20 micro litros de glifosato para la dosis de 1g/l; 100 micro litros (5g/l) y 300 micro litros para la dosis de 15ml/l.

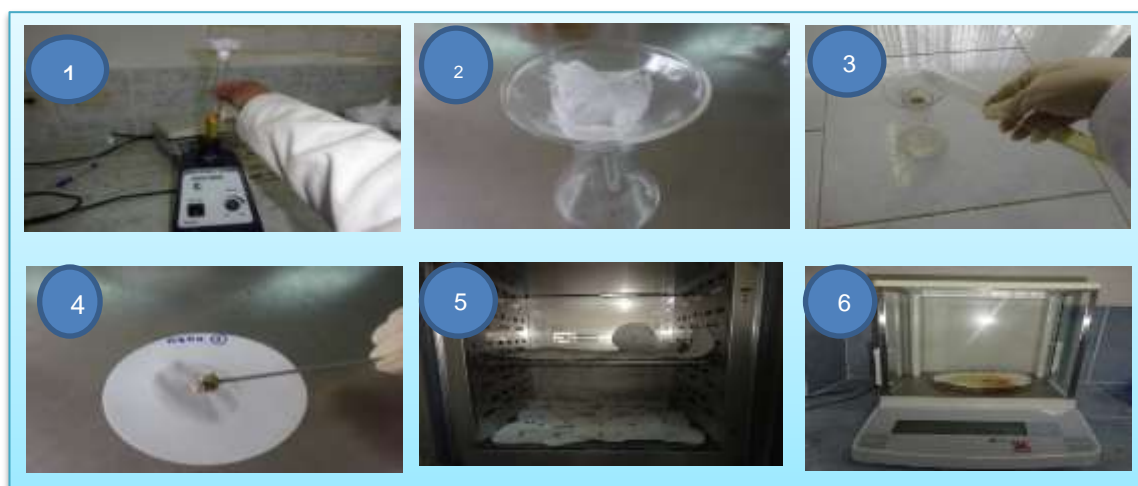
Con la ayuda de un sacabocados previamente esterilizado se procedió a extraer los discos de los 6 hongos seleccionados y se los colocó en los tubos de ensayo que contienen glifosato y en los que no contienen glifosato. Los tubos fueron sellados con algodón y parafilm, mismos que fueron introducidos en el agitador magnético durante 7 días para su crecimiento.



Fotografía 19. Siembra de hongos para el ensayo con glifosato

A los siete días de haber incubado los hongos se procedió a pesarlos, previo a esto se agitó cada uno de los tubos de ensayo con la finalidad de que se desprendan los hongos de las paredes de los tubos.

En un vaso de precipitación insertamos un embudo con una gasa esterilizada, en el cual colocamos el hongo y con ayuda de la microespátula presionamos hasta eliminar todo el medio de cultivo. Una vez listo el hongo lo colocamos en un papel filtro y lo llevamos a la estufa durante 12 horas a una temperatura de 75°C. Se pesan cada una de las muestras en la balanza analítica.



Fotografía 20. Proceso pesaje de hongos

3.4.3.1.1.2 Ensayo de hongos con Cipermetrina

Para el ensayo con Cipermetrina se escogieron seis hongos (M6H1, M6H2, M6H4, M6H6, M8H1 y M8H4), el ensayo consistió en triplicar cada uno de los hongos utilizando diferentes concentraciones de Cipermetrina 1g/l y 2g/l, de igual manera se triplicaron los hongos en medio de cultivo sin presencia de Cipermetrina, dando un total de 36 réplicas de cada dosis aplicada.

✓ Aislados en Medio Solido

Se preparó medio de cultivo sólido utilizando agar nutriente rosa, para ello se pesó 11,52 g del producto y se añadió 360ml de agua destilada, posteriormente se esterilizó el medio de cultivo en el autoclave.

La siembra se la realizó en la cámara de bioseguridad, al medio cultivo se le incorporó 18 micro litros de glifosato para la dosis de un 1g/l y 36 micro litros para la dosis de 2g/l.




Fotografía 21. Incorporación de Cipermetrina en el medio de cultivo

Se vierte el medio de cultivo que tiene Cipermetrina en 18 cajas Petri y se coloca el medio de cultivo que no contiene el producto de igual manera en 18 cajas Petri, se espera hasta que el medio se solidifique y se cubre las cajas para iniciar con la siembra. Con el sacabocados previamente esterilizado se corta 6 discos de cada

hongo seleccionado, para cada ensayo y se siembra tres discos en el medio con Cipermetrina y tres en el testigo por cada una de las dosis.

A los 3 días de haber incubado las cepas de hongos en las dos concentraciones de Cipermetrina se procede a medir el crecimiento radial durante 5 días consecutivos, con la finalidad de conocer en cuál de las concentraciones de desarrollo mejor el hongo.

Tabla 7. Crecimiento radial de hongos en las diferentes concentraciones de Cipermetrina

<i>Dosis 1g/l</i>	<i>Dosis 2g/l</i>
	
	
	
	
	



Fuente: (Autora, 2015)

✓ Aislados en Medio Liquido

Se preparó medio de cultivo líquido utilizando Potato Dextrosa en una cantidad de 11,52 g del producto tomando en consideración la dosis dada en el envase (23 g/litro).

Se coloca en una gradilla 36 tubos de ensayo previamente esterilizados, a los cuales se les adiciona 20ml del medio de cultivo, se tapa cada tubo con un tapón de algodón, se sellan con papel aluminio y llevan a esterilizar en el autoclave.

La siembra se la realiza en la cámara de bioseguridad, a cada tubo de ensayo se le añade 1 micro litros de Cipermetrina para la dosis de 1g/l y 2 micro litros (2g/l).

Con la ayuda de un sacabocados previamente esterilizado se extrae los discos de los 6 hongos seleccionados y se los coloca en los tubos de ensayo que contienen Cipermetrina y en los tubos que servirán como testigo, se sella con algodón y parafilm, se lleva los tubos al agitador magnético durante 7 días para su crecimiento.

A los siete días de haber incubado los hongos se procede a pesarlos previo a esto se agito cada uno de los tubos de ensayo con la finalidad de que se desprendan los hongos de las paredes de los tubos.

En un vaso de precipitación insertamos un embudo con una gasa esterilizada en el cual colocamos el hongo y con ayuda de la microespátula aplastamos hasta eliminar todo el medio de cultivo. Una vez listo el hongo lo colocamos en un papel

filtro y lo llevamos a la estufa a durante 12 horas a una temperatura de 75°C. Se pesan cada una de las muestras en la balanza analítica.

3.4.3.1.2 Biodegradación bacteriana de plaguicidas (glifosato y Cipermetrina) por microorganismos autóctonos en medio de cultivo líquido

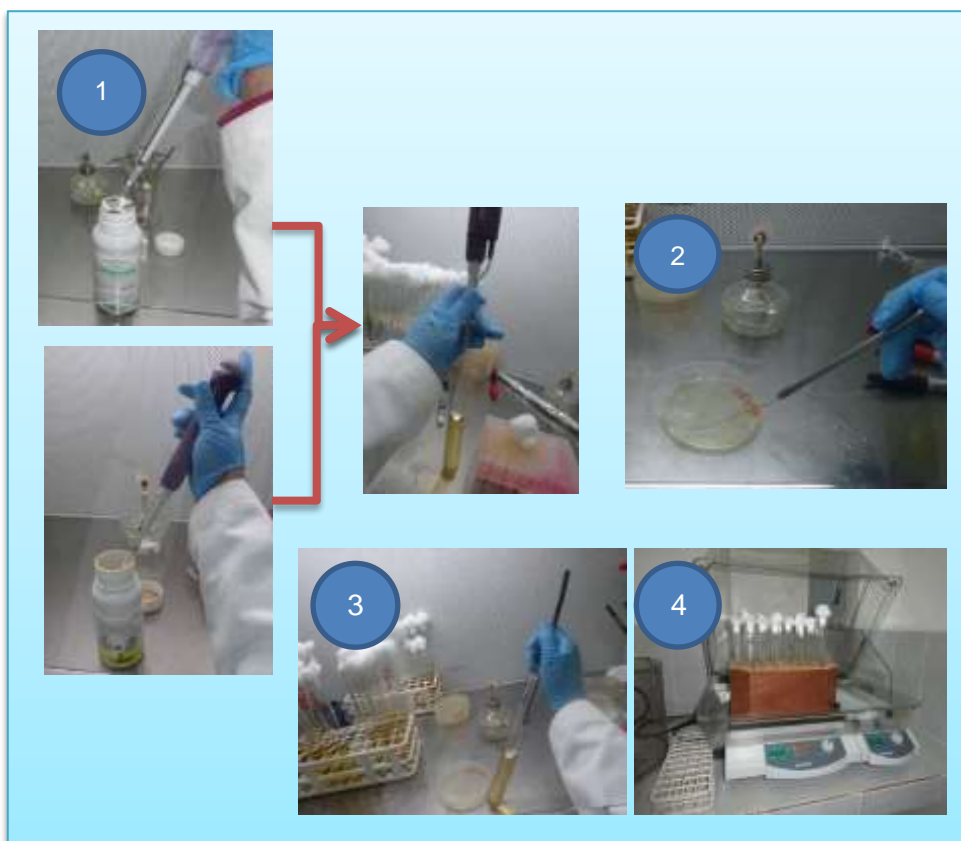
El aislamiento de las bacterias se lo hizo en medio de cultivo líquido, haciendo 3 réplicas de las 3 cepas de bacterias escogidas, lo que representa la incubación de 9 cepas de cada una de las dosis aplicadas (1g/l, 5g/l y 15g/l) de glifosato y las dosis de Cipermetrina (1g/l y 2g/l) con sus respectivos testigos.



Fotografía 22. Bacterias seleccionadas para el ensayo

Para preparar el medio de cultivo se pesó 2,88 g de agar nutriente, tomando como base la dosis dada en el producto (8g/l), se colocó en un vaso de Erlenmeyer y se le añadió 360ml de agua destilada, se colocó 20ml del medio esterilizado en los 18 tubos de ensayo de cada una de las dosis aplicada de glifosato y Cipermetrina.

En la cámara de bioseguridad se colocó 20 micro litros para la dosis de (1g/l), 100 micro litros (5g/l) y 300 micro litros (15g/l) para el ensayo de glifosato y para el ensayo con Cipermetrina se colocó 1 micro litro para la dosis de 1g/l y 2 micro litros (2g/l), en cada uno los 9 tubos de ensayo de las diferentes dosis. Con la ayuda de una aza previamente esterilizada se sembró las 3 cepas de bacterias en cada uno de los tubos, se llevó al agitador magnético para su desarrollo durante 7 días.



Fotografía 23. Siembra de bacterias con glifosato y Cipermetrina

A los siete días de haberse incubado las bacterias de los ensayos con glifosato y Cipermetrina se realizó la espectrofotometría que es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda para ello se utilizó el Espectrofotómetro, que es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma. Antes de someter las muestras a este proceso se agitó los tubos de ensayo que contiene las bacterias desarrolladas, con la finalidad de que la bacteria se disperse en todo el líquido y poder extraer la muestra de 300 ml, misma que se la ubicó en las cubetas del espectrofotómetro, como base para la obtención de los datos en una cubeta de espectrofotómetro medio de cultivo líquido puro.



Fotografía 24. Ensayo de bacterias y hongos sometidos a espectrofotometría



CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Resultado para el primer objetivo

4.1.1 Selección del lugar del muestreo

Se obtiene la ubicación geográfica de los lugares donde se tomaron las muestras.

Tabla 8. Ubicación geográfica del sector muestreado

Código MUESTRAS	Longitud	Latitud
	X (Este)	Y (Norte)
M1	598271	9545996
M2	595287	9546151
M3	593930	9545940
M4	592700	9546126
M5	591468	9545224
M6	591178	9541795
M7	590223	9542739
M8	598628	9543420
M9	598387	9543809
M10	603412	9551110
M11	604456	9552168
M12	604698	9552483

Fuente: (Autora, 2015)



Figura 3. Mapa de las zonas de muestreo del Cantón Pindal
Fuente: (Autora, 2015)

4.1.2 Encuestas aplicadas en la zona de intervención

Tabla 9. Resultados de encuestas aplicadas en la zona de intervención

N°	Preguntas	Opciones		Resultados de las encuestas aplicadas													T ot al	Porcentaje %	
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
3	Principales cultivos que siembra	Maíz		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
		Guineo		1													1	7.69	
		Caña			1												1	7.69	
		Coco		1													1	7.69	
		Café							1								1	7.69	
		Fréjol									1						1	7.69	
4	Cultivo principal	Maíz		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00		
		OTRO															0	0.00	
5	Realiza rotación	SI															0	0.00	
		No		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
6	Realiza intercalamientos	SI															0	0.00	
		No		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
		Cuales															0	0.00	
		Porque															0	0.00	
7	Álteraciones del suelo	A	Si	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	12	92.31	
			No							1							1	7.69	
		B	Si		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	92.31
			No	1														1	7.69
		C	Si	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00
			No															0	0.00
		D	Si	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00
			No															0	0.00
		E	Si															0	0.00
			No	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00
8	Alteraciones a las aguas	A	Si	1	1	1		1	1	1		1	1	1	1	1	11	84.62	
			No				1				1							2	15.38
		B	Si	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	12	92.31
			No								1							1	7.69
		C	Si	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	12	92.31
			No								1							1	7.69
		D	Si	1	1	1		1		1		1		1	1	1	1	9	69.23
			No				1				1		1					3	23.08
9	Alteraciones al aire	A	Si	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
			No															0	0.00
		B	Si	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00
			No															0	0.00
		C	Si	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11	84.62
			No			1	1											2	15.38
		D	Si	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00
			No															0	0.00



10	Aplica fertilizantes químicos	Si		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
		No														0	0.00	
		Cuáles?	Urea	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11	84.62
			Yaramila	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	92.31
11	Usa medios de protección a la hora de aplicación	Si			1		1		1	1	1		1		1	7	53.85	
		No		1		1		1		1	1		1			6	46.15	
12	Aplica Fertilizantes orgánicos o biofertilizantes	Si														0	0.00	
		No		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
		Cuáles?														0	0.00	
																0	0.00	
																0	0.00	
13	Aplica productos químicos para controlar plagas y enfermedades	Si		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
		No														0	0.00	
		Cuáles?	Gramox one	1	1	1	1	1		1	1		1			8	61.54	
			Amina		1										1	2	15.38	
			Gesapri n	1	1	1	1	1		1	1				1	8	61.54	
			Glifocor											1		1	7.69	
			Ranger										1		1	2	15.38	
			Matamo nte	1	1	1	1	1		1			1	1		8	61.54	
			Semacin	1												1	7.69	
			Glifopac	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00	
14	Aplica productos biológicos para controlar plagas y enfermedades	SI													0	0.00		
		No		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.00		
		Cuáles?																
15	Conoce los perjuicios que ocasiona la aplicación de productos químicos	Si		1	1	1	1		1	1	1	1		1	1	1	11	84.62
		No							1				1				2	15.38
16	Posee algún tipo de padecimiento a la salud	Si		1					1	1	1	1			1	6	46.15	
		No			1	1	1	1				1		1	1	7	53.85	
		Padeci miento	Dolor de cabeza	1	1			1			1			1		1	6	46.15
			Prostata						1								1	7.69
			Gastritis							1	1				1	3	23.08	
			Intoxicac ión		1						1				1	3	23.08	
			Mareo								1					1	7.69	
			Colester ol												1	1	7.69	

Fuente: (Autora, 2015)

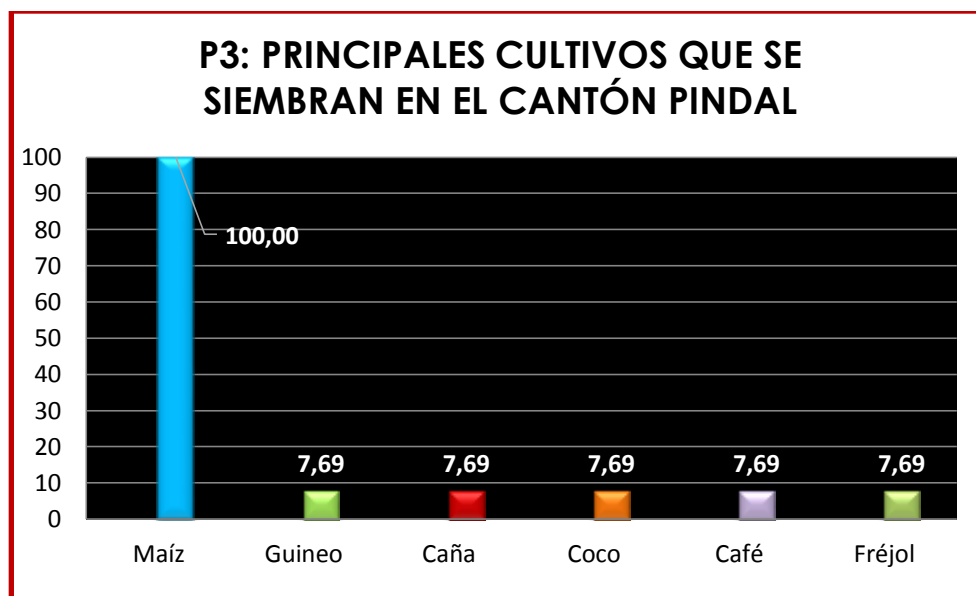


Figura 4. Principales cultivos que se siembran en el cantón
Fuente: (Autora, 2016)

El cantón Pindal cuenta con un clima cálido seco, con una temperatura que fluctúa entre los 20 y 26 grados centígrados, con tierras fértiles que le hacen un ambiente apropiado para cultivar diversos productos por lo cual en la figura 2 se muestra los principales cultivos que se siembran, siendo el maíz el más destacado con un 100%, y los cultivos como guineo, caña, coco, café y frejol se siembran en un 7,69%.

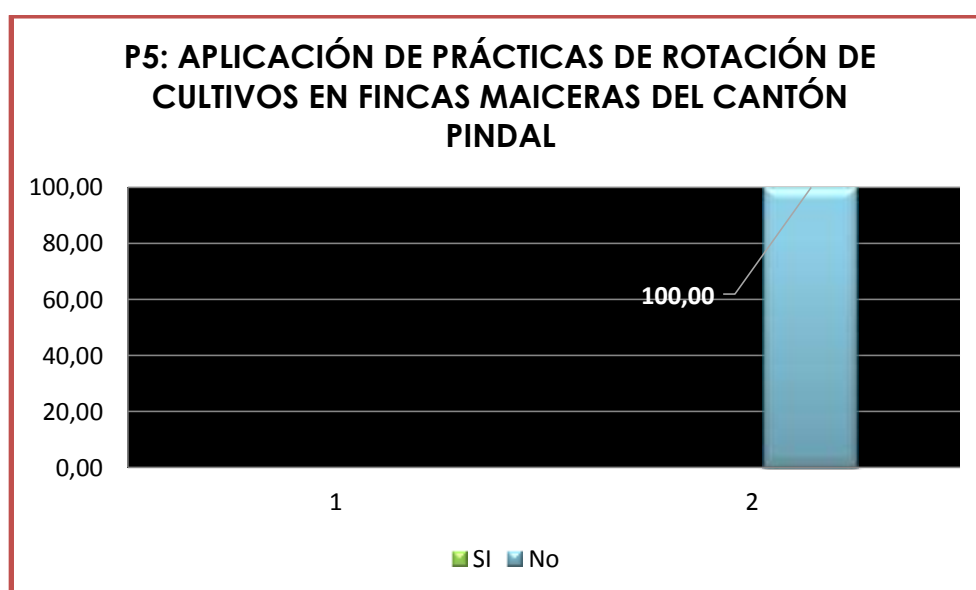


Figura 5. Aplicación de prácticas de rotación de cultivos
Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 5 se indica que los habitantes del cantón Pindal en un 100% no realizan prácticas de rotación de cultivos o no alternan con otros cultivos, puesto que el maíz es su principal que representa el principal ingreso económico para la familia.

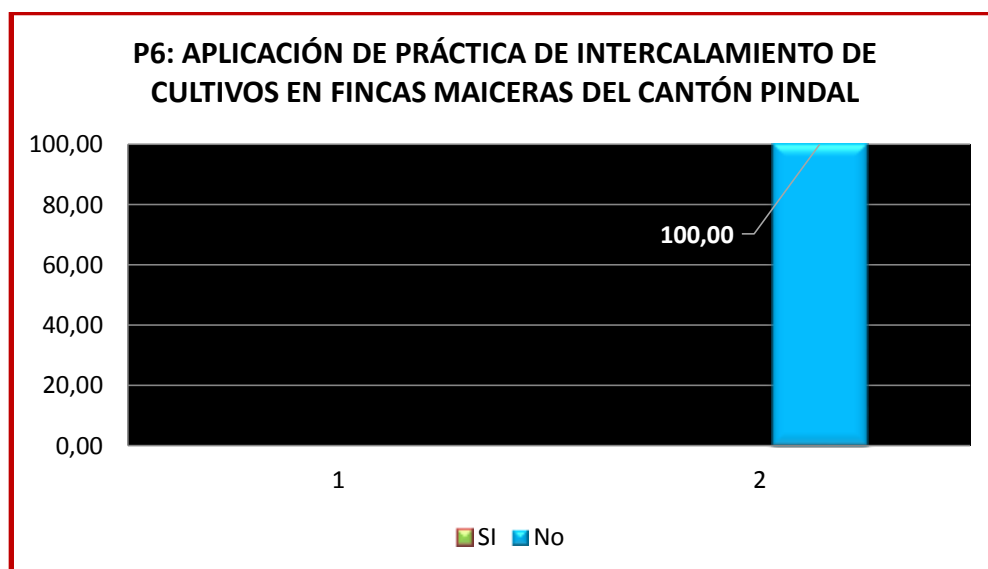


Figura 6. Cultivo principal en el cantón
Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 6 se muestra que no se realizan prácticas de intercalamiento de cultivos en las fincas maiceras del cantón Pindal en un 100%, debido a que el maíz es el único cultivo que les proporciona ingresos económicos.



Figura 7. Alteraciones al suelo: a) Importante pérdida de cobertura vegetal, b) Clara inestabilidad de talud, c) Evidencia de erosión antropogénica, d) Evidencia de erosión natural y e) Mínima intervención del suelo.

Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 7 se indica las alteraciones de los suelos maiceros del cantón Pindal en donde los habitantes enuncian que ha existido una importante pérdida de cobertura vegetal (a) en un 92.31%; en un 92.31%; se muestra que existe una inestabilidad de talud (b); en un 100% existe erosión antropogenica (c), erosión natural (d) y ha existido una mínima intervención del suelo (e).

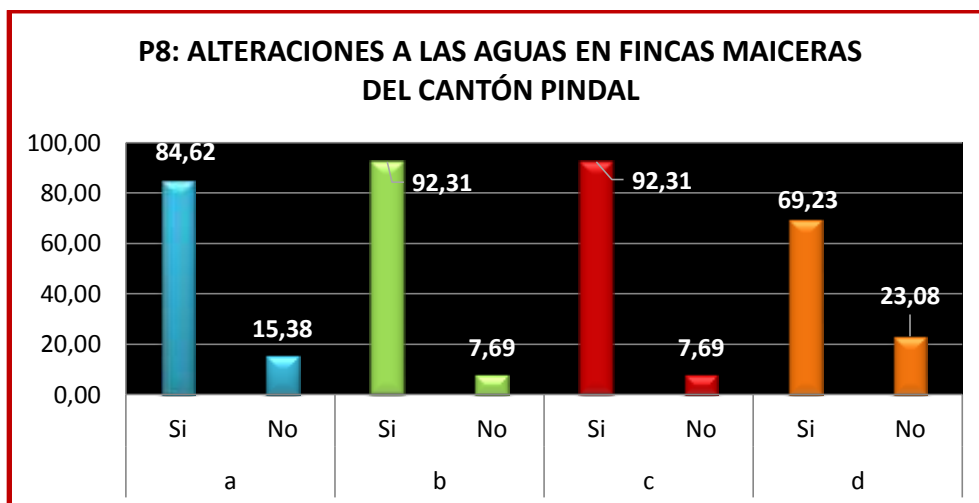


Figura 8. Alteraciones a las aguas: a) Importante alteraciones de fuentes y drenajes superficiales, b) Generación de vertidos, c) Contaminación por materia orgánica de drenajes menores, d) Desviación del curso de fuentes y drenajes menores (riachuelos)

Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 8 se indica el porcentaje de las alteraciones que ha sufrido el agua que se utiliza para regar los cultivos de maíz en donde se evidencia que ha existido (a) importantes alteraciones de fuentes y drenajes superficiales en un 84.62%; (b) generación de vertidos y (c) contaminación por materia orgánica de drenajes menores en 92.31% y (d) desviación del curso de fuentes y drenajes menores riachuelos en un 69.23%.

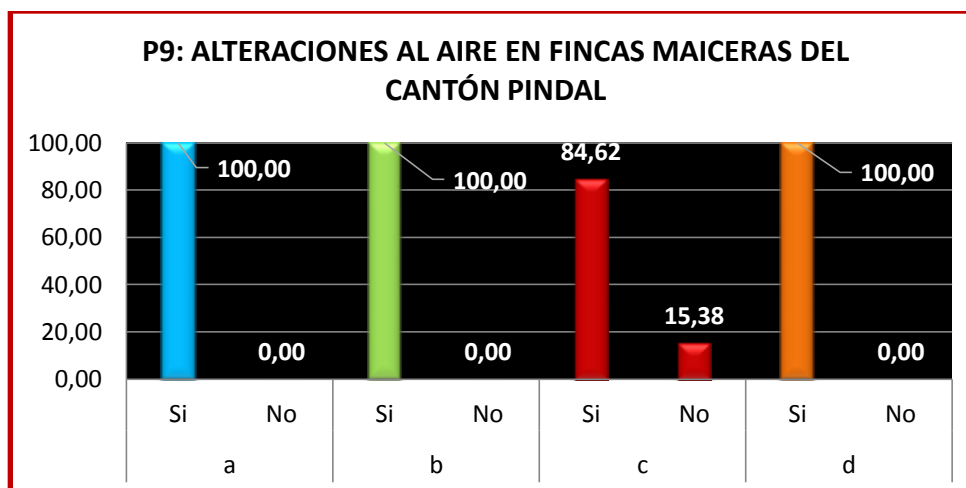


Figura 9. Alteraciones al aire: a) Generación de olores a sustancias químicas, b) Emisión de gases, c) Generación de ruidos, d) Generación de partículas y polvos.
Fuente: (Autora, 2016)

En lo que respecta a las alteraciones que ha sufrido el aire de las zonas maiceras se indica que en un 100% se ha producido (a) generación de olores a sustancias químicas, (b) emisión de gases y (d) generación de partículas de polvo y en un 84.62% (c) generación de ruidos.

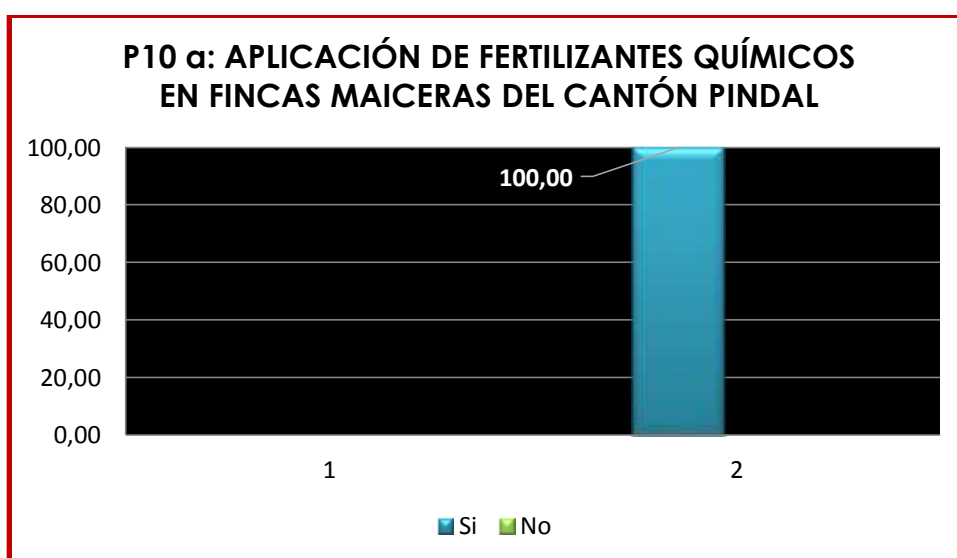


Figura 10. Aplicación de agroquímicos en fincas maiceras
Fuente: (Autora, 2016)

La aplicación de agroquímicos en las fincas maiceras seleccionadas es de un 100%, los productores los aplican ya que obtienen beneficios a corto plazo, disminuyen la proliferación de plagas que dañan los cultivos de maíz y de esta manera pueden obtener una buena producción para la comercialización.

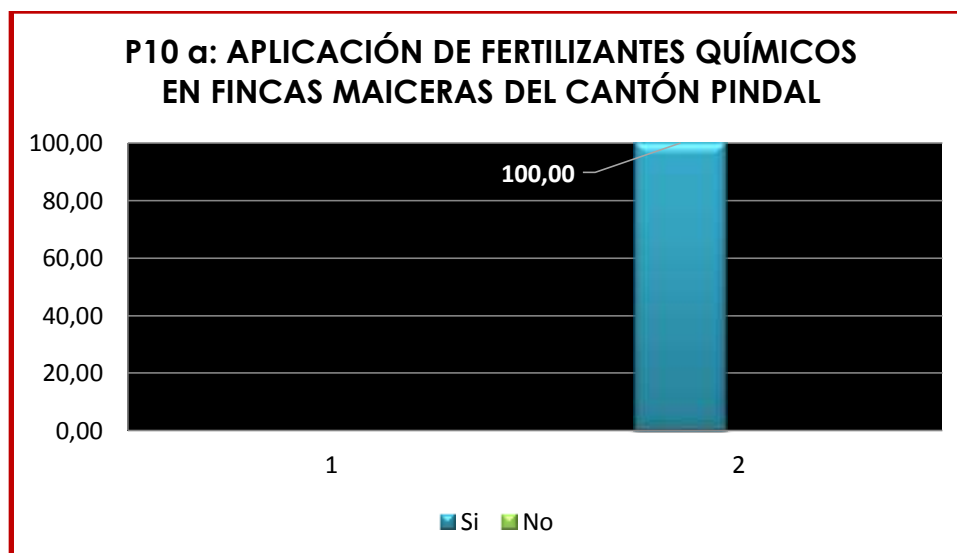


Figura 11. Aplicación de fertilizantes químicos en las fincas maiceras
Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 11 se muestra que los agricultores de las fincas seleccionadas en un 100% aplican fertilizantes químicos, ya que estos productos contienen nutrientes necesarios como el nitrógeno, potasio, fósforo para ayudar a las plantas a crecer y así obtener una buena producción para la comercialización

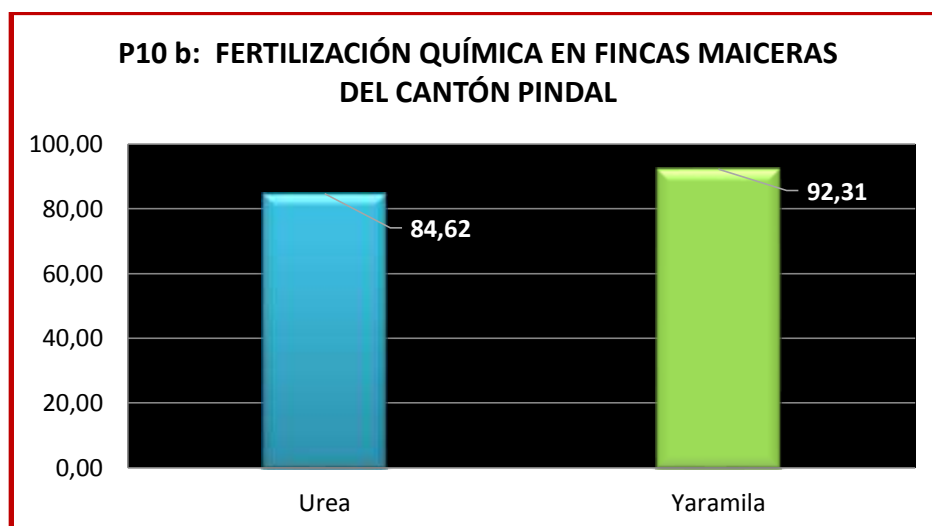


Figura 12. Fertilización química en fincas maiceras
Fuente: (Autora, 2016)

Las fincas maiceras del cantón Pindal son fertilizadas con Yaramila con un 92.31% y Urea con 84.62% porque les proporciona grandes ventajas como: promueve el crecimiento en las fases iniciales del cultivo, aportando una gran cantidad de fósforo para complementar su demanda energética, aporta nitrógeno el cual



permite tener una rápida disponibilidad para el cultivo, con fósforo, magnesio, azufre y zinc esencial para la etapa de enraizamiento. La urea es uno de los fertilizantes más concentrados en nitrógeno (46%) y el más económico en el mercado.

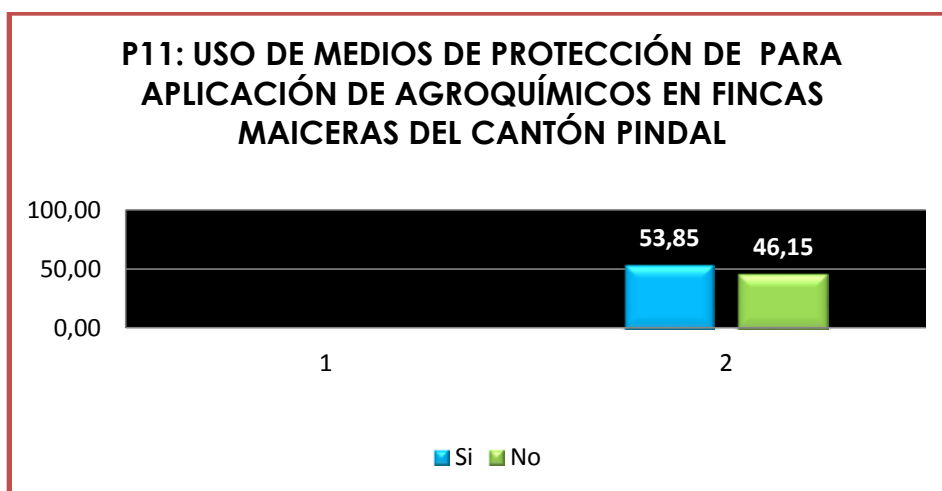


Figura 13. Uso de medios de protección para la aplicación de agroquímicos
Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 13 se evidencia que un 53.85% de productores de maíz utilizan medios de protección para aplicar los productos porque conocen los perjuicios o peligros que pueden ocasionar a la salud y al medio ambiente; y un 46.15% no utilizan medios de protección.

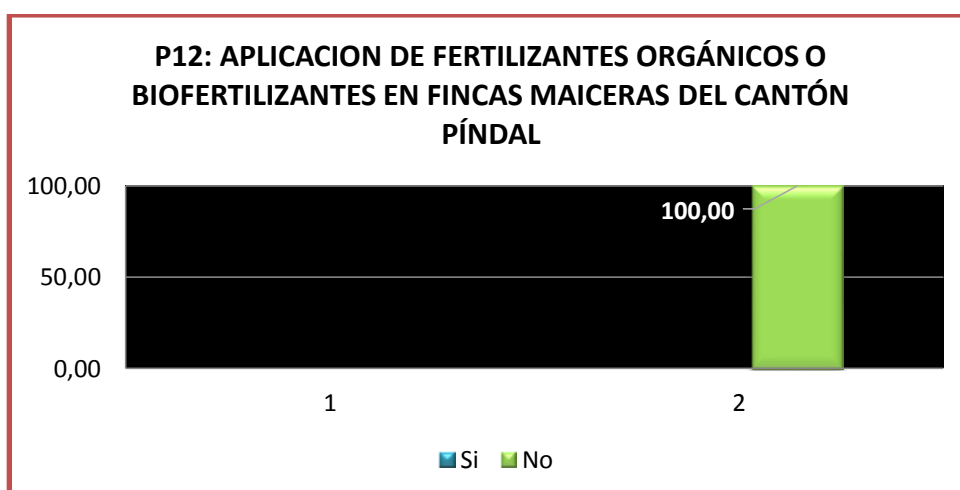


Figura 14. Aplicación de fertilizantes orgánicos o biofertilizantes
Fuente: (Autora, 2016)

Los productores de maíz del cantón Pindal en un 100% no aplican fertilizantes orgánicos o biofertilizantes, debido a que no obtienen resultados inmediatos y esto les ocasiona pérdidas en su producción.

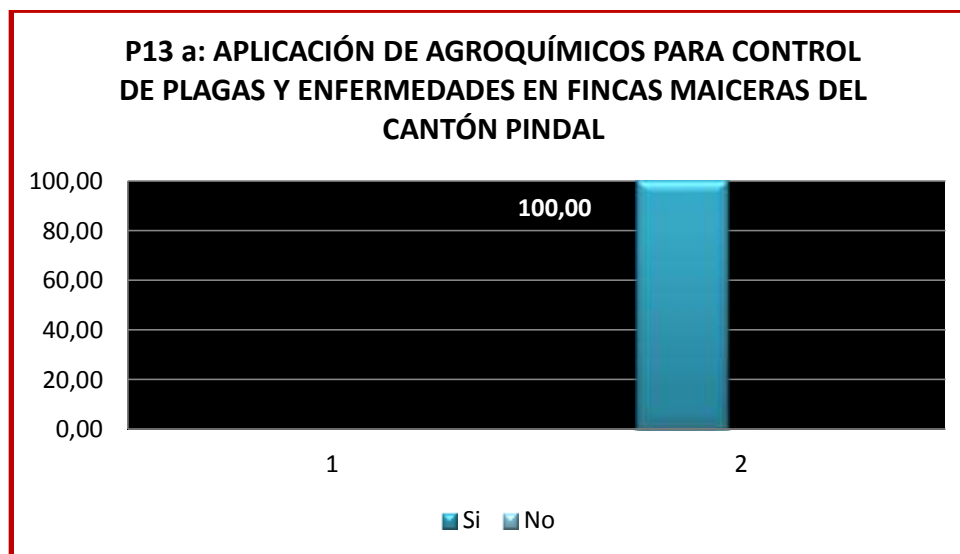


Figura 15. Aplicación de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades
Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 15 se muestra que un 100% de los maiceros aplican agroquímicos para el control de plagas y enfermedades por su bajo costo, facilidad y la rápida efectividad del producto.

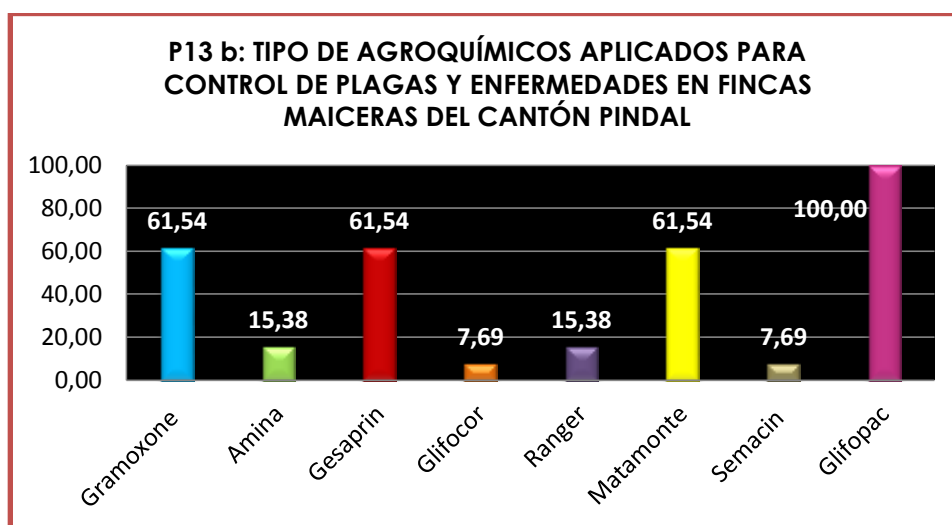


Figura 16. Tipo de agroquímicos aplicados para el control de plagas y enfermedades
Fuente: (Autora, 2016)

Los agroquímicos más utilizados por los maiceros del cantón Pindal son el Glifosato con un 100%, seguido de Gramoxone, Gesaprin, Matamonte con un 61.54%; Amina y Ranger en un 15.38% y Glifocor y Semacin en un 7.69%.

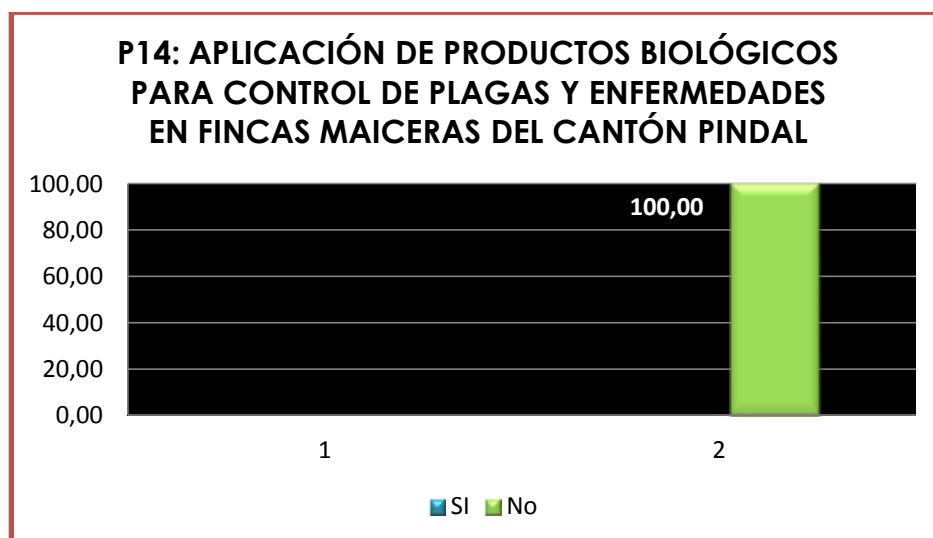


Figura 17. Aplicación de productos biológicos para el control de plagas y enfermedades

Fuente: (Autora, 2016)

En la figura 17 se muestra que los productores de maíz en un 100% no aplican productos biológicos para el control de plagas y enfermedades por su alto costo y desconocimiento de su elaboración y aplicación.

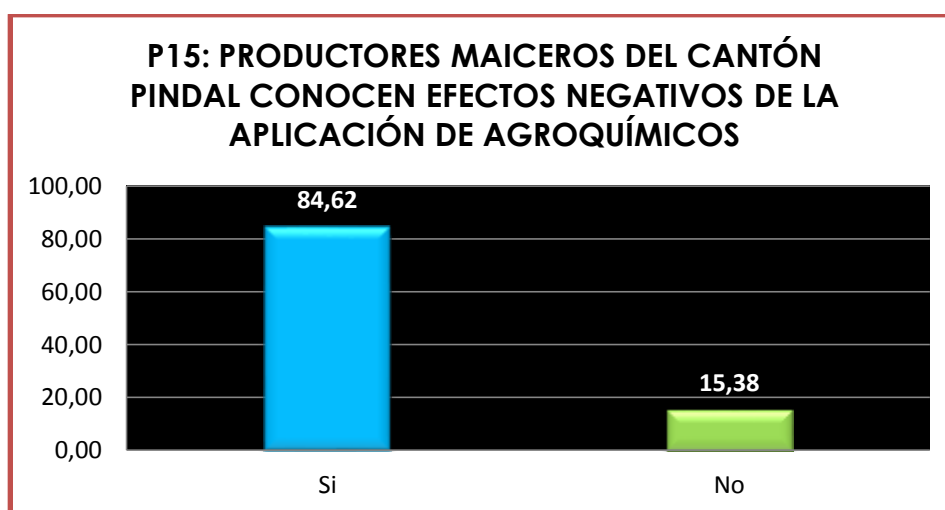


Figura 18. Productores maiceros del cantón conocen los efectos negativos de la aplicación de agroquímicos

Fuente: (Autora, 2016)



Los productores de maíz del cantón Pindal conocen en un 84.62% los efectos negativos de la aplicación de agroquímicos pero si principal objetivo es obtener una buena producción y un 15% desconoce los efectos negativos de estos productos.

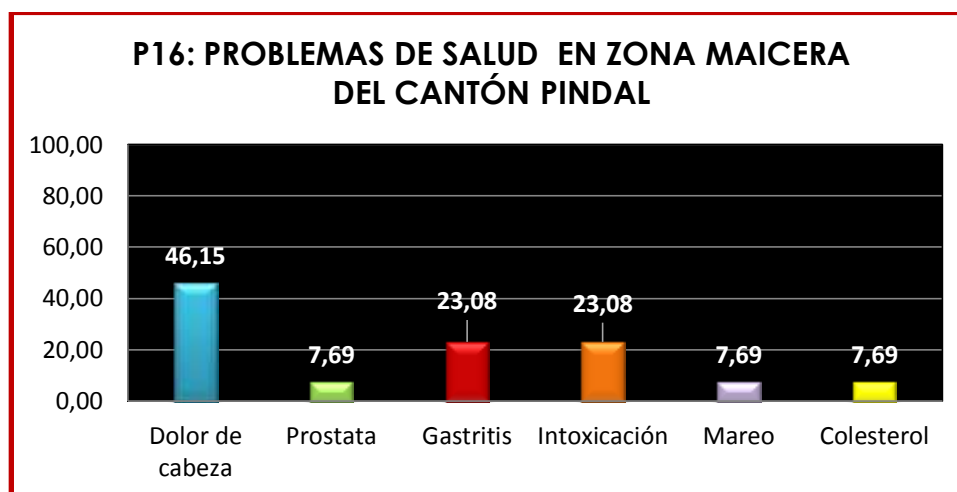


Figura 19. Problemas de salud en la zona maicera
Fuente: (Autora, 2016)

Los principales problemas que se han presentado en la zona maicera del cantón Pindal son en un 46.15% dolor de cabeza; Gastritis e intoxicación en 23.08% y Próstata, Mareo y Colesterol en 7.69%.

4.1.3 Parámetros físicos

Tabla 10. Evaluación de parámetros físicos en las muestras de suelos obtenidas del Cantón Pindal

COD. LAB.	CÓD. CAM.	ANÁLISIS MECÁNICO % TFSA			TEXTURA	Ph
		Ao	Lo	Ac		
1674	1 (ABC)	25,2	37,8	37	FoAC	6.18
1675	2 (DEF)	19,2	41,8	39	FoAcLo	5.67
1676	3 (GHI)	17,2	41,8	41	AcLo	5.7
1677	4 (SKL)	61,2	23,8	15	FoAo	5.62

*TFSA (Tierra Fresca Seca al Aire): Ao (Arena), Lo (Limo), Ac (Arcilla). Textura: AoFo (Franco Arenoso), FoAo (Franco Arcilloso).

Fuente: (Análisis realizado en Laboratorio de suelos de la UNL, 2015. Método de Bouyoucus mejorado)



4.1.3.1 Clase textural

La composición granulométrica promedio de los suelos analizados presentan los siguientes resultados clase textural franco arcilloso en la M1 (ABC), la muestras M2 (DEF) franco arcilloso limoso, M3 (GHI) suelo arcillo limoso y M4 (SKL) suelo franco arenoso, con estos resultados se podría indicar que los suelos del cantón Pindal son suelos franco arcillosos en un 50%, franco arenoso 25% y arcillo limoso 25%. Ver anexo 2.

4.1.3.2 pH

En el cuadro 6 se indica que el valor del pH de la M1 es de 6.18 que representa a un suelo ligeramente ácido, en las muestras M2, M3 y M4 contienen valores que van de 5.62 a 5.70 corresponde a suelos (medianamente ácidos). Lo que nos indica que el 75% de los suelos son medianamente ácidos y el 25% tiene un pH ligeramente ácido. El Acuerdo Ministerial N° 028 del MAE, establece que el pH del suelo para uso agrícola debe estar en un rango de 6 – 8, de no ser así se deben realizar actividades de mejoramiento.

4.1.3.3 Parámetros Químicos

Tabla 11. Evaluación de parámetros químicos en las muestras de suelos obtenidas de las fincas del cantón Pindal

COD. LAB.	CÓD. CAM.	M.O	P2O5	K2O	C.E.
		%	Ppm	Ppm	Mmhos/cm
1674	1 (ABC)	3,10	36,67	65,63	0.219
1675	2 (DEF)	4,61	14,66	34,79	0.249
1676	3 (GHI)	3,97	59,64	105,26	0.179
1677	4 (SKL)	3,60	40,81	13,01	0.165

Fuente: (Análisis realizado en Laboratorio de suelos de la UNL, 2015)

4.1.3.4 Materia Orgánica

El promedio del contenido de materia orgánica de los suelos de las fincas seleccionadas del cantón Pindal es de 3.82%, que de acuerdo a Iñiguez, 2010 se interpreta como una concentración baja de materia orgánica; en la muestra M1 se



encuentra el valor mínimo de 3.10% y en la M2 el valor medio de 4.61%, siendo así que los suelos dedicados a la producción maicera en el cantón Pindal, ameritan la aplicación de prácticas de mejoramiento de fertilidad de los suelos a fin de contar con niveles óptimos de productividad.

4.1.3.5 Fósforo

La concentración de Fósforo en la M2 es baja, en el caso de la Muestras 1,3 y 4 representan un nivel alto ya que se encuentran en el rango de 30.1 – 40, según la interpretación de Iñiguez 2010, lo que significa que la mayoría de suelos están en niveles óptimos de fósforo.

4.1.3.6 Potasio

De acuerdo a Iñiguez 2010, la concentración de potasio en las muestras M1, M2 y M4 es baja ya que se encuentran en un rango de 50-100, mientras que en la muestra 3 presenta un nivel medio ya que se encuentran en el rango de 100.1 - 150.

4.1.3.7 Conductividad Eléctrica

Los suelos dedicados a la producción de maíz en el cantón Pindal presentaron niveles aceptables de conductividad eléctrica, registrándose dentro de la denominación No Salinos.

4.2 RESULTADO DEL SEGUNDO OBJETIVO ESPECÍFICO

Caracterizar e identificar morfocultural y molecularmente microorganismos autóctonos con potencial biorremediador de sustancias xenobióticas provenientes de agroquímicos en la zona de estudio.

4.2.1 Análisis morfo-cultural

4.2.1.1 Conteo Colonias de bacterias

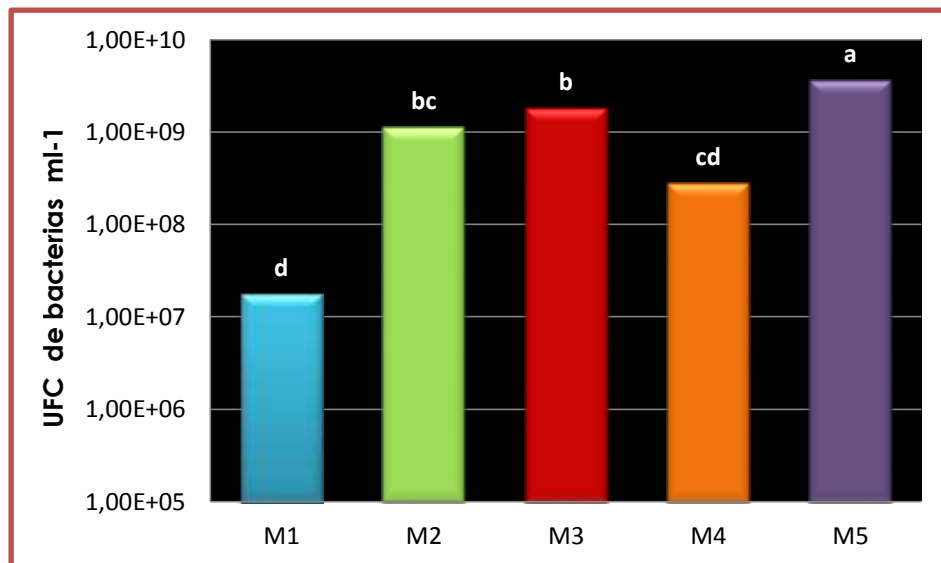


Figura 20. Cuantificación de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo en muestras procedentes de las fincas seleccionadas del cantón Pindal (UFC g suelo-1). Letras desiguales en las columnas difieren para $P < 0.05$ por Bonferroni. Error Estandar: 25.5. Ver datos estadísticos en anexo 3.

En la figura 20, se puede observar las Unidades Formadoras de Colonias, siendo la muestra M5 la que tienen mayor cantidad de bacterias cultivables, misma que está representada por las cepas (a), seguida de M3 y está simbolizada con (b) y cuenta con un valor de $(1.79E+09)$, la muestra M2, identificada con las letras (bc) tiene un valor $(1.11E+09)$ y las muestras M1 y M4 son las que contienen menor cantidad de bacterias cultivables por gramo de suelo.

4.2.1.2 Conteo de Colonias de hongos

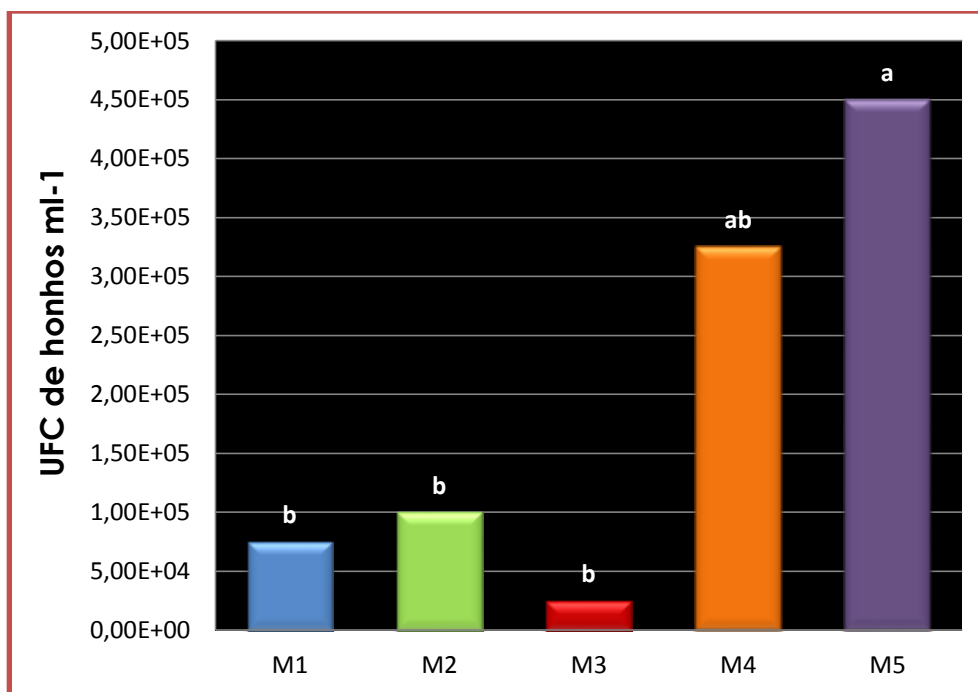


Figura 21. Cuantificación de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo en muestras procedentes de las fincas seleccionadas del cantón Pindal (UFC g suelo⁻¹). Letras desiguales en las columnas difieren para $P < 0.05$ por Bonferroni. Error Estandar: 25.5. Ver datos estadísticos en anexo 5.

En la figura 21, se puede observar las Unidades Formadoras de Colonias, siendo la muestra M5 la que tienen mayor cantidad de hongos cultivables ($4.50E+05$), misma que está representada por la letra (a), seguida de M4 la cual está simbolizada con (ab) y cuenta con un valor de ($3.25E+05$); por otra parte se tiene que la muestra M3 identificada con la letra (b) tiene la menor cantidad de hongos cultivables por gramo de suelo.

4.2.2 Caracterización Morfocultural

Tabla 12. Caracterización morfocultural de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos de las fincas del cantón Pindal

CARACTERIZACIÓN MORFOCULTURAL DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE SEDIMENTOS								
N°	Cepas	Crecimiento	Apariencia	Forma	Elevación	Borde	Color	Tinción
1	M1B1	+++	++	++++	+	+++++	4	Micrococos gram negativos agrupados en racimos
2	M1B2	++	+++	++	+++	+	4	Cocos gram positivos agrupados en racimos
3	M1B3	+++	++	++++	+	+++++	4	Bacilos largos gram positivos agrupados en cadenas
4	M1B4	+++	++++	++++	+	++	4	Bacilos cortos gram positivos agrupados en racimos



5	M1B5	+++	+++	++	+++	+	1	Bacilos cortos gram negativos agrupados e cadenas
6	M1B6	++	++++	+++	++	+++++	8	Bacilos largos gram positivos agrupados en racimos
7	M2B1	++	++++	++	+++	+	4	Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en racimos
8	M3B1	++	++++	++	+++	+	4	Bacilos cortos gram positivos agrupados en racimos
9	M3B2	++	++++	++	+++	+	8	Micrococos gram negativos agrupados en racimos
10	M3B3	+++	++++	++	+++	+	4	Bacilos largos gram positivos agrupados en racimos
11	M4B1	+++	++++	++++	+	+++++	4	Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadena, esporulados
12	M4B3	++	+++	++	++++	+	8	Cocos gram negativos agrupados en racimos
13	M4B4	+++	++++	++++	+	+++++	4	Bacilos cortos gram negativos agrupados e cadenas
14	M4B6	++	++++	++	++++	+	4	Cocos gram positivos agrupados en racimos
15	M6B1	++	+++	++++	++	+++++	1	Micrococos gram negativos agrupados en cadenas
16	M6B2	+++	+++	++++	++	+++++	1	Bacilos cortos gram negativos agrupados en cadenas
17	M6B4	+++	++++	++++	++	++	1	Bacilos largos gram positivos agrupados en racimos
18	M6B5	++	+++	++	+++	+	1	Micrococos gram positivos agrupados en racimos
19	M6B6	+++	+++	++	+	++	1	Bacilos largos gram negativos esporulados
20	M7B1	++	+++	++	++	++	7	Bacilos cortos gram positivos agrupados
21	M7B2	++	+++	++++	++	+++++	7	Bacilos cortos gram positivos agrupados
22	M7B3	+++	+++	++++	++	+++++	4	Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadenas
23	M7B4	++	+++	+++	+	++	1	Cocos gram negativos agrupados en cadenas
24	M7B5	+++	++	++++	++	+++++	4	Bacilos largos gram negativos agrupados en cadenas, esporulados
25	M7B7	++	+++	+++	++	+++++	4	Cocos gram positivos agrupados
26	M8B1	++	+++	++++	++	+	7	Cocos gram positivos agrupados en racimos
27	M8B2	++	+++	++	+++	+	7	Cocos gram positivos agrupados en racimos
28	M8B3	++	+++	++++	+	+++++	4	Bacilos largos gram positivos agrupados en cadenas
29	M8B4	+++	++	++++	+	+++++	4	Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadenas
30	M9.1B2	++	+++	+++	+	++	1	Cocos gram negativos agrupados en racimos
31	M9.1B3	+++	+++	++	++	++	7	Cocos gram positivos agrupados en racimos
32	M9.1B4	+++	++	+++	++	+++	4	Bacilos largos gram negativos agrupados en cadenas
33	M9.1B5	+++	+++	++	++	+	1	Bacilos cortos gram negativos agrupados
34	M9.2B1	++	+++	++	+++	+	1	Bacilos gram positivos agrupados en cadenas
35	M9.2B2	++	+++	++	+++	++	7	Micrococos gram positivos agrupados en cadenas
36	M9.2B3	++	++++	+++	++	+++++	4	Micrococos gram negativos agrupados en cadenas
37	M9.2B4	++	+++	++	+++	+	1	Micrococos gram positivos agrupados en racimos
38	M9.2B5	+++	++	++++	+	+++++	4	Micrococos gram positivos agrupados en racimos
39	M9.2B6	+++	+++	+++	+	+++++	4	Cocos gram positivos agrupados en racimos



40	M10B1	+++	+++	++++	+	+++++	7	Bacilos largos gram positivos agrupados en cadenas
41	M10B2	+++	++	++++	++	+++++	4	Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadenas
42	M10B4	++	+++	++++	++	+++++	7	Cocos gram negativos agrupados en racimos
43	M11B1	++	+++	++++	+++	+++++	1	Cocos gram negativos agrupados en racimos

Crecimiento: abundante (+++), moderado (++); **Apariencia:** Equinulado (+), Barbadoa (++) y Difuso (+++); **Forma:** Puntiforme (+), Circular (++) , Filamentosa (+++) e Irregular (++++); **Elevación:** Plana o aplastada (+), Elevada (++) , Convexa baja (+++) y Mamelonda (++++); **Bordes:** Entero o Continua (+), Ondulado (++) y Lobulado (+++); **Color:** Beige (1), Traslucida (2), Crema Traslucida (3), Blanca (4), Traslucida amarilla (5), Beish (6), Amarillo (7), Anaranjada (8) y Rosada (9).

Fuente: (Autora, 2015)

En la tabla 12 se presenta la caracterización morfo cultural de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos bacterianos de las fincas del cantón Pindal, en lo que respecta al crecimiento el 53% fue moderado y el 47% restante abundante. Las colonias bacterianas de apariencia 3 predominan con un 60% seguida de las de apariencia 4 con un 24%, y apariencia 2 con 16%; las colonias bacterianas de forma irregular se encuentran en un 44%; Filamentosas 38% y circulares 18%.

La elevación plana o aplastada en las bacterias aisladas se encuentra en un 29%; elevada 40%; convexa baja 27% y mamelonda 4%. Los bordes de la colonia identificados fueron 5 en un 45%, lobulado 2%; 4 2% entero o continuo 31% y ondulado 20%. La coloración de las bacterias fueron 47% blancas; 24% beige; 22% amarillas y 7% anaranjadas. Las bacterias identificadas en la tinción de Gram fueron bacterias gram positivas el 56% y bacterias gram negativas el 44%. (Ver resultado en Anexo 6).

En cuanto a la agrupación se determinó mayor cantidad de bacillus con un 55% distribuido de la siguiente manera:

- ✓ Bacilos agrupados en cadena 2%
- ✓ Bacilos largos agrupados en cadenas en 12%
- ✓ Bacilos largos agrupados en racimos en 7%
- ✓ Bacilos largos agrupados cadena, esporulada en 2%
- ✓ Bacilos largos esporulados en 2%
- ✓ Bacilos cortos agrupados en 7%



- ✓ Bacilos cortos agrupados en cadenas en 7%
- ✓ Bacilos cortos agrupados en racimos en 5%
- ✓ Bacilos rectangulares agrupados en cadena en 7%
- ✓ Bacilos rectangulares agrupados en racimos en 2%
- ✓ Bacilos rectangulares agrupados en cadena esporulados en 2%

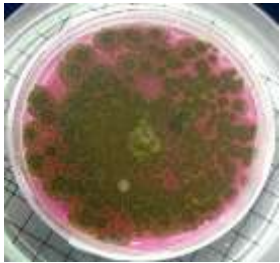
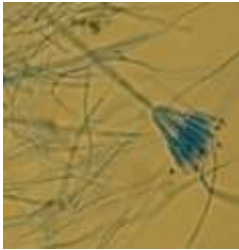
Seguido de las bacterias agrupadas en forma de cocos con un 28% de las cuales se dividen así:

- ✓ Cocos agrupados en racimos en 24%
- ✓ Cocos agrupados en cadena en 2%
- ✓ cocos agrupados en 2%




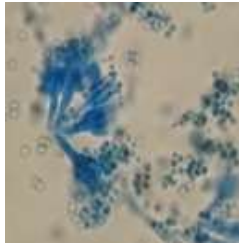





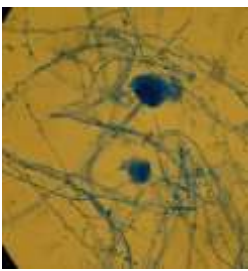
En menor proporción se encuentran las bacterias agrupadas en micrococos con un 17% de las cuales tenemos:

- ✓ Micrococos agrupados en racimos 10%
- ✓ Micrococos agrupados en cadenas en un 7%


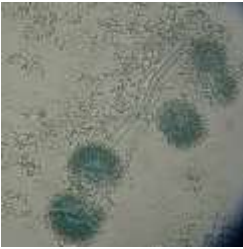




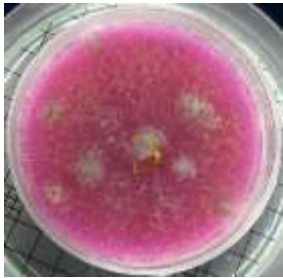


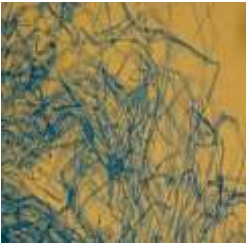
Tabla 13. Caracterización morfo cultural de las colonias de hongos obtenidas de los aislamientos de las muestras de suelo


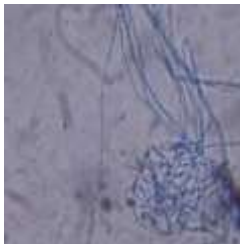



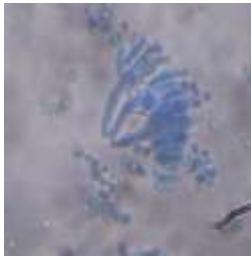

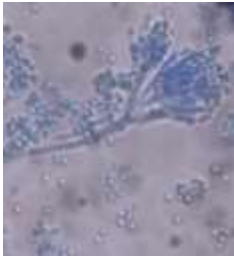

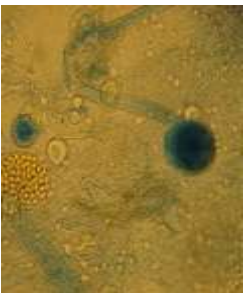
CODIGO	FOTOGRAFIA CAJA	CARACTERISTICAS FENOTÍPICAS	FOTO MICROSCOPIO	CARACTERSTICAS
M1H8 M5H1 M6H3 M9.1H4 M10H1		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso plano • Color verdoso • Crecimiento no radial 		<i>Penicillium sp.</i>



M1H1 M2H4.1 M6H1		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso plano. • Color verdoso amarillento. • Crecimiento no radial 		<i>Penicillium chrysogenum</i>
M4H2 M8H1 M8H3		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio esponjoso plomo • Color plomo verdoso • Crecimiento radial 		<i>Penicillium verruculosum</i>
M8H5 M9.1H3		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio esponjoso plomo con inclusiones • Color blanquecino verdoso • Crecimiento radial 		<i>Penicillium pinophilum</i>
M10H2		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio esponjoso plomo con inclusiones • Color blanquecino verdoso • Crecimiento no radial 		<i>Penicillium camemerti</i>
M3H1 M4H1 M6H4 M6H5		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso plano • Color verdoso • Crecimiento no radial 		<i>Aspergillus fumigatus</i>



M6H6 M7H1		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio esponjoso plomo • Color blanquecino amarillento • Crecimiento radial 		Aspergillus terreus
M6H8		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso • Color blanquecino verdoso • Crecimiento radial 		Aspergillus niger
M4H5		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso • Color blanquecino • Crecimiento radial 		<i>Fusarium oxysporum f. cubense</i>
M5H2		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso • Color blanquecino • Crecimiento radial 		<i>Fusarium graminearum</i>
M1H7 M8H4 M9.1H1 M9.1H2		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso aéreo • Color blanquecino • Crecimiento radial 		<i>Mucor circinelloides f. circinelloides</i>

M2H4		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso • Color blanquecino • Crecimiento radial 		<i>Mucor circinelloides f. janssenii</i>
M2H2 M4H3		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio esponjoso plomo • Color verdoso • Crecimiento no radial 		<i>Scytalidium sp.</i>
M3H3.1		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio esponjoso plomo • Color plomo verdoso • Crecimiento radial 		<i>Neosartorya fischeri</i>
M3H3		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso • Color blanquecino • Crecimiento radial 		<i>Eurotiomycete s sp.</i>
M4H4		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso plomo • Color blanquecino • Crecimiento radial 		<i>Talaromyces flavus</i>

M2H3 M6H2		<ul style="list-style-type: none"> • Micelio algodonoso plomo • Color blanquecino • Crecimiento radial 		<i>Uncultured aspergillus clone</i>
--------------	---	---	--	-------------------------------------

Fuente: (Autora, 2015)

En la tabla 13 se evidencia la caracterización morfológica e identificación genética de las colonias de hongos obtenidas de los aislamientos de las fincas del cantón Pindal, el crecimiento fue radial en un 79% y no radial en 21%.

Se identificaron 8 géneros de las cepas de hongos obtenidos, teniendo un mayor número de *Penicillium* con un 42.5% de las cuales encontramos especies como:

- ✓ *Penicillium sp.* 15.2%
- ✓ *Penicillium chrysogenum* 9.1%
- ✓ *Penicillium verruculosum* 9.1%
- ✓ *Penicillium pinophilum* 6.1%
- ✓ *Penicillium camemberti* 3.0%

En un segundo lugar encontramos a los *Aspergillus* con un 18.2% distribuidos según su especie de la siguiente manera

- ✓ *Aspergillus fumigatus* 9.1%
- ✓ *Aspergillus terreus* 6.1%
- ✓ *Aspergillus niger* 3.0%

En menor proporción se identifo *Mucor* en un 12.1% con las especies de:

- ✓ *Mucor circinelloides f. circinelloides* 9.1%
- ✓ *Mucor circinelloides f. janssenii* 3.0%



Seguido de *Fusarium* con un 6% del cual se identificó las especies de *Fusarium oxysporum f. cubense* 3.0% y *Fusarium graminearum* 3.0%. En menor cantidad se encontraron los géneros de *Scytalidium sp.* y *Uncultured aspergillus clone* con 6.1% y en una proporción mínima encontramos a *Neosartorya fischeri*, *Eurotiomycetes sp.* y *Talaromyces flavus* en un 3.0%.

4.3 RESULTADO PARA EL TERCER OBJETIVO

Evaluar el potencial biorremediador de aislados microbianos, basado en métodos de bio-absorción para degradar las principales sustancias xenobióticas identificadas en el diagnóstico.

4.3.1 Métodos de Bio-absorción

4.3.1.1 Biodegradación de hongos con la aplicación de plaguicidas (glifosato y Cipermetrina) en cultivos sólidos y líquidos.

4.3.1.1.1 Ensayo de hongos con Glifosato

Para el ensayo se seleccionó 6 cepas de hongos para determinar la Bio-absorción en medio sólido y líquido.

✓ Ensayo de hongos en medio de cultivo sólido

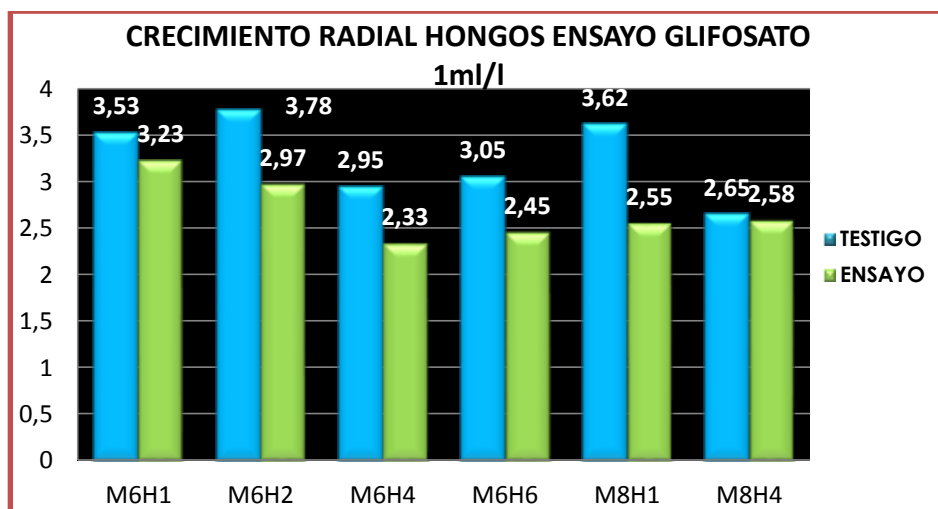


Figura 22. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 1g/l

En la figura 22, se puede observar que la cepa de hongo que inhibió menor el crecimiento micelial con la concentración de glifosato de 1g/l a los 7 días de haber sido incubada, fue M8H4 puesto que obtuvo un crecimiento de 2.65 (testigo) y 2.58 cm (ensayo), lo que representa el 1% de inhibición; M8H4 tuvo un crecimiento radial de 3.62 cm y el hongo expuesto al glifosato tuvo 2.55 cm lo que representa un 30% de inhibición. Seguido de la cepa de hongo M6H2 y M6H4 con un 21% de inhibición. Lo que nos indica que M8H4 tuvo una buena adaptación a esta concentración de glifosato y se la podría utilizar en procesos de biorremediación por su buena absorción del producto.

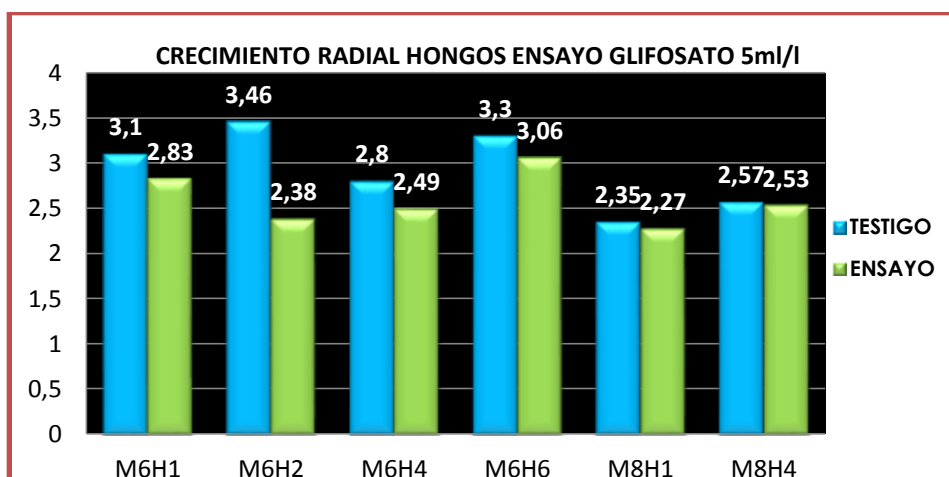


Figura 23. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 5g/l

A los siete días de haber incubado los hongos en medio sólido enriquecido con glifosato en una dosis de 5 ml se pudo determinar que el hongo que mayor inhibió tuvo en su crecimiento con respecto a su testigo fue M6H2 puesto que de 3.46cm de crecimiento radial inhibió en 2.38 cm, lo que representa un 31% seguido de M6H1 con 8%, el nivel más bajo de inhibición lo tuvo M8H4 con un 2% de inhibición puesto tuvo una buena absorción del producto por lo teste hongo puede ser utilizado para procesos de biorremediación.

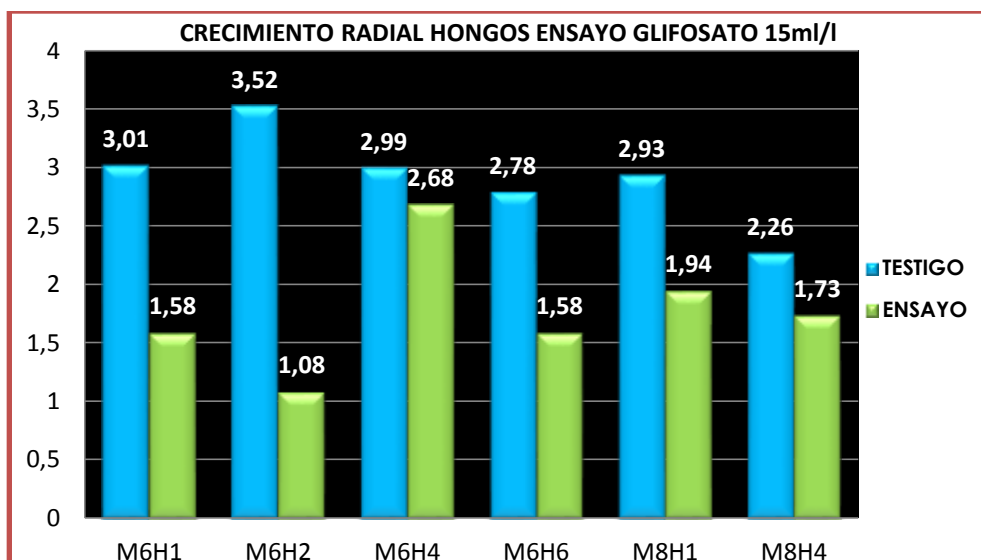


Figura 24. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 15g/l

En la figura 24 se observa el comportamiento del crecimiento de los hongos durante el proceso de biodegradación o biotransformación del producto químico glifosato en concentración de 15g/l, en donde el hongo M6H2 inhibió el crecimiento en 69%, seguido de M6H1 con 48%; M6H6 con 43%, M8H1 con 34%, M6H4 fue el hongo que menor inhibió el crecimiento micelial con 10%. Lo cual nos indica que este hongo se puede utilizar para procesos de biorremediación debido a su resistencia a esta dosis aplicada. Ver anexo 6.

✓ Ensayo de hongos medio liquido con glifosato

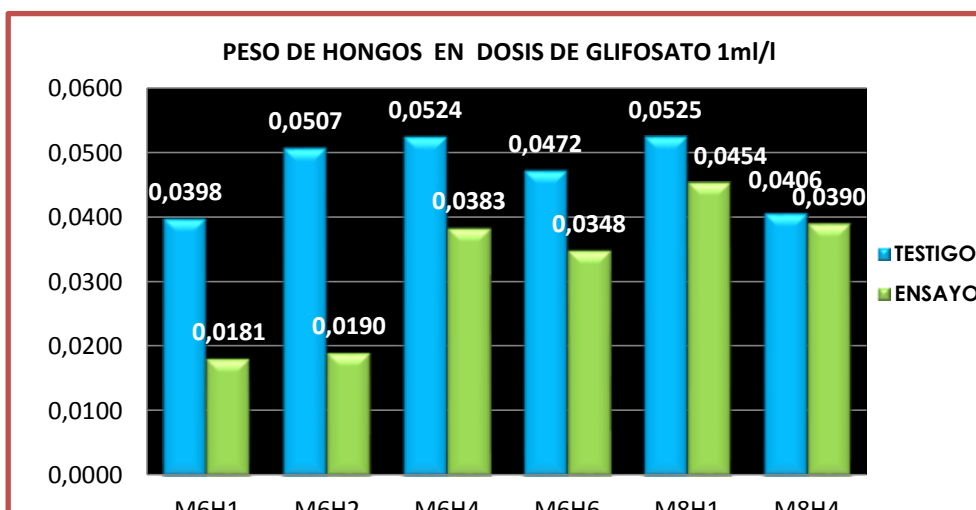


Figura 25. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 1g/l

En la figura 25 se puede observar el peso de los hongos inoculados en un medio de cultivo líquido al cual se le incorporo 1gr/l de glifosato en donde se nota que el hongo que mayor inhibió la masa micelial en seco fue M6H2 con un 62%; M6H1 con 55%; M6H4 con 27%; M6H6 con 26%; M8H1 con 14% y M8H4 es el hongo que menor inhibió el crecimiento con 4%, por lo tanto este hongo se lo puede utilizar en procesos de biorremediación por su alta adaptación a la dosis aplicada de glifosato.

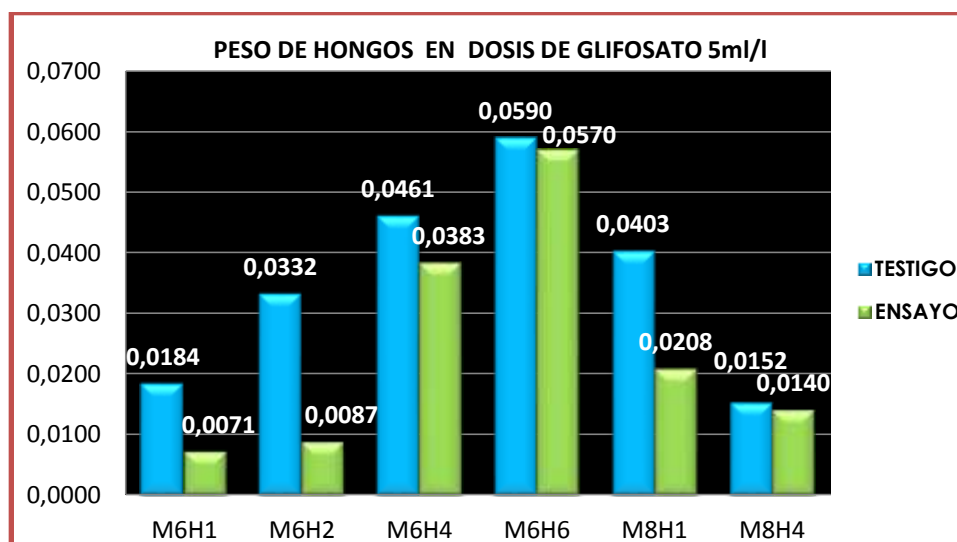


Figura 26. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 5g/l

En la figura 26 se puede observar el peso seco de los hongos inoculados en un medio de cultivo líquido al cual se le incorporo 5g/l de glifosato, se nota que el hongo que inhibió el crecimiento mayoritariamente es M6H2 con un 74%; M6H1 con 61%; M8H1 con 48%; M6H4 con 17%; M8H4 con 8% y M6H6 con 3% lo que significa que se adaptó a la dosis de glifosato incorporada puesto que pudo obtener un peso del 92% con respecto a su testigo.

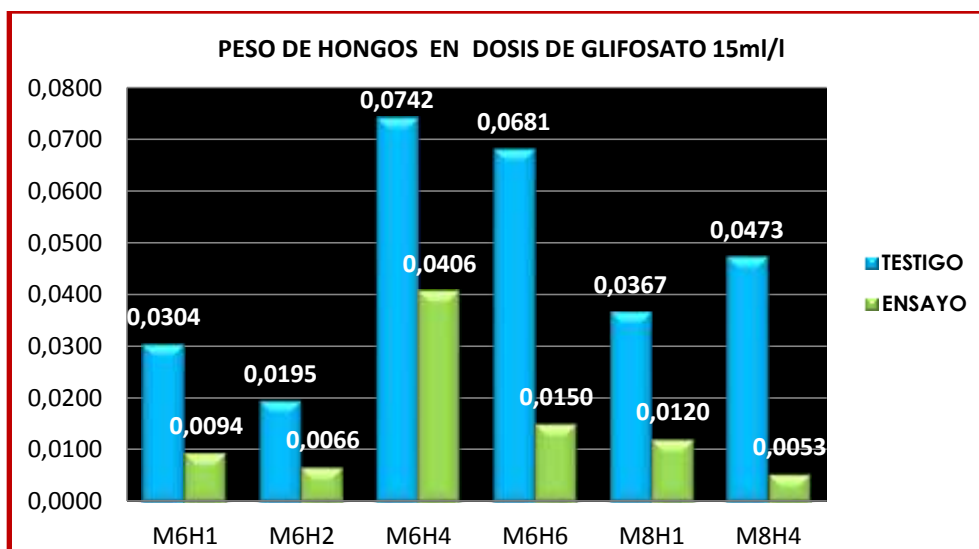


Figura 27. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados a concentración de 5g/l

En la figura 27 se evidencia que el hongo que mayor inhibió el crecimiento fue M8H4 ya que obtuvo un peso seco del 89%; M6H6 con 78%; M6H1 con 69%; M8H1 con 67%; M6H2 con 66% y M6H4 con 45%. Lo que significa que fue el hongo que más se adaptó a la aplicación de 5g/l de glifosato. Ver anexo 10.

4.3.1.1.2 Ensayo de hongos con Cipermetrina

✓ Medio solido

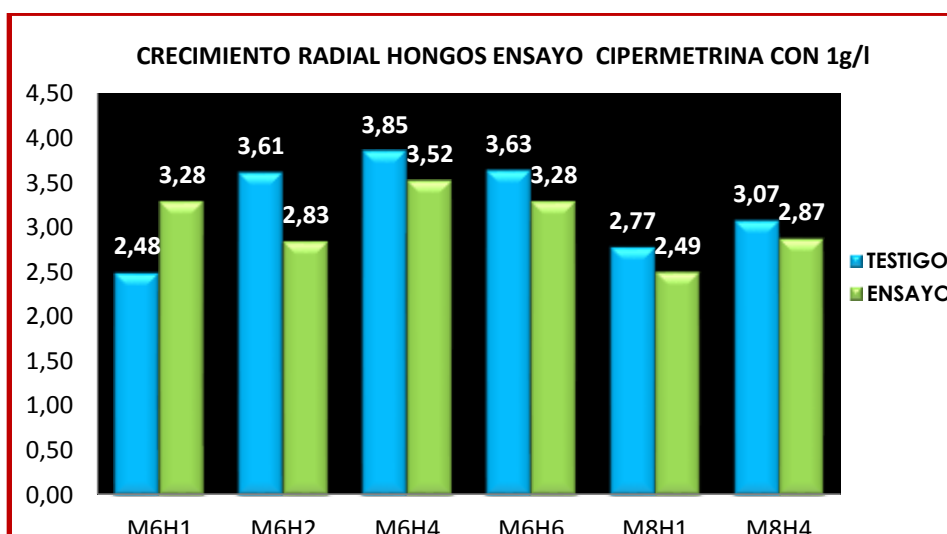


Figura 28. Inhibición del crecimiento de hongos producida por Cipermetrina en aislados a concentración de 1g/l



En la figura 28 se puede observar la inhibición del crecimiento de los hongos a los cuales se les aplicó Cipermetrina en una dosis de 1g/l, teniendo como resultado que M6H2 inhibió el crecimiento con 22%; M6H6 y M8H1 con 10%; M6H4 con 9% y M8H4 con 7%, mientras que M6H1 obtuvo un crecimiento del 24% más que su testigo lo cual nos indica que degradó a la Cipermetrina y la tomó como medio de alimento por lo cual obtuvo un crecimiento mayor que su testigo, por lo tanto es un bacteria importante que la podemos utilizar para procesos de biorremediación.

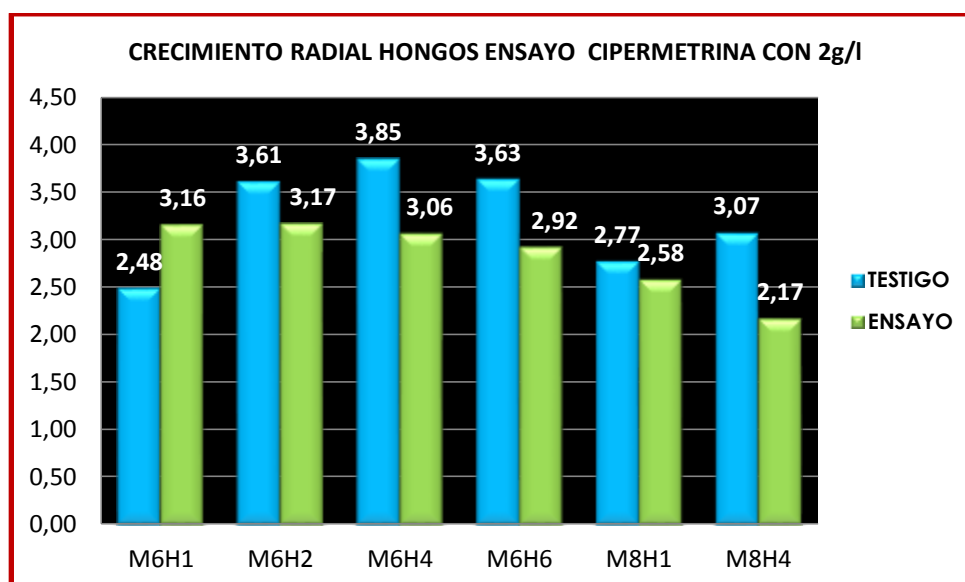


Figura 29. Inhibición del crecimiento de hongos producida por Cipermetrina en aislados a concentración de 2g/l.

En la figura 29 se puede observar la inhibición del crecimiento de los hongos a los cuales se les aplicó Cipermetrina en una dosis de 1g/l, teniendo como resultado que M8H4 inhibió el crecimiento con 29%; M6H4 con 21% M6H6 con 20%; M6H2 con 12%; M8H1 con 7%, mientras que M6H1 obtuvo un crecimiento del 21% más que su testigo lo cual nos indica que degradó a la Cipermetrina y la tomó como medio de alimento por lo cual obtuvo un crecimiento mayor que su testigo, por lo tanto es un bacteria importante que la podemos utilizar para procesos de biorremediación. Ver anexo 11.

✓ Medio líquido

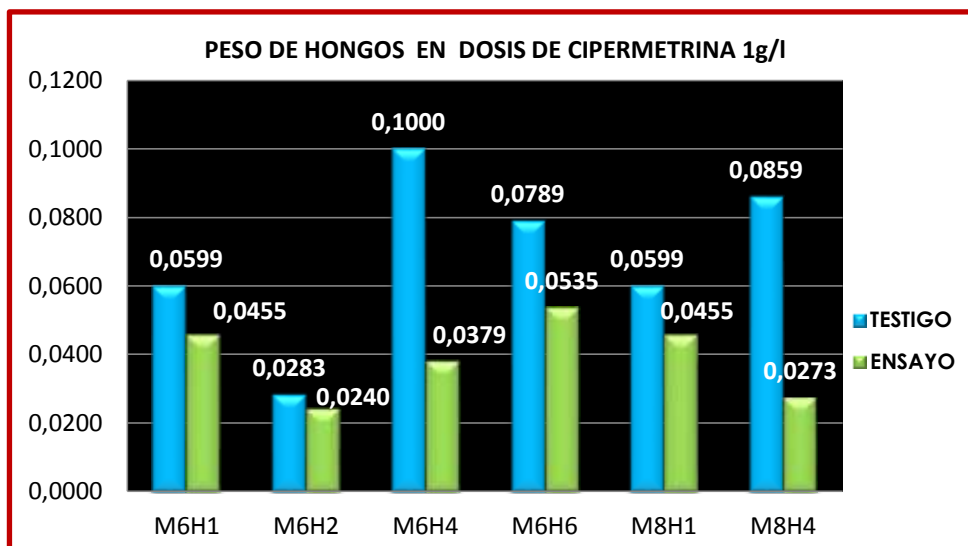


Figura 30. Inhibición del crecimiento de hongos producida por Cipermetrina en aislados, a concentración de 1g/l.

En la figura 30 se puede observar el peso seco de los hongos inoculados en un medio de cultivo líquido al cual se le incorporo 1g/l de glifosato se evidencia que el hongo que inhibió el crecimiento mayoritariamente es M8H4 con un 68% ; M6H4 con 62%; M6H1 y M8H1 con 24% y M6H2 con 15%. Es importante tomar en cuenta al hongo M6H2 para procesos de biorremediación por su alta absorción del producto químico Cipermetrina.

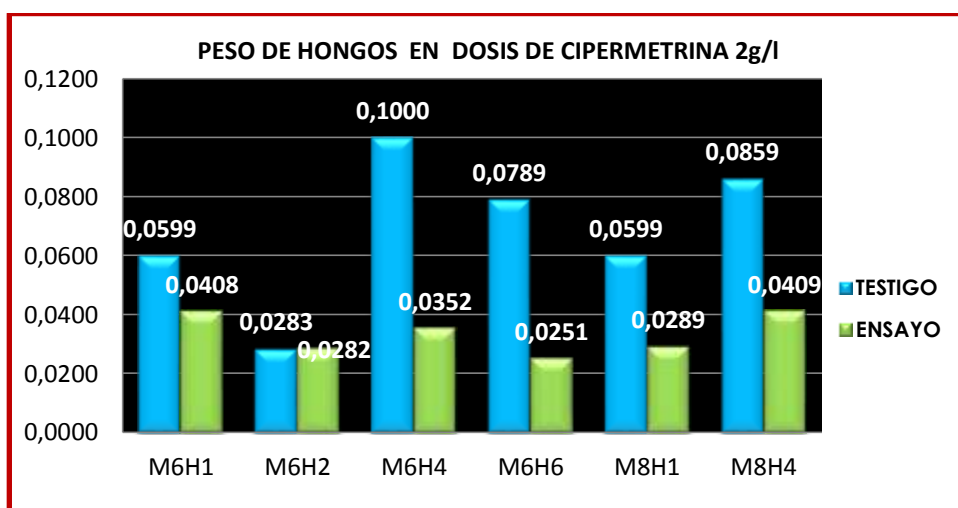


Figura 31. Inhibición del crecimiento de hongos producida por el Glifosato en aislados, a concentración de 2g/l



En la figura 31 se puede observar el peso seco de los hongos inoculados en un medio de cultivo líquido al cual se le incorporo 2g/l de glifosato se evidencia que el hongo que inhibió el crecimiento mayoritariamente es M6H6 con un 68%; M6H4 con 65%; M8H1 y M8H4 con 52%; M6H1 con 32% y M6H2 con 0,3%. Lo que nos muestra que tuvo un buen grado de absorción del producto por lo cual es importante tomarlo en cuenta para procesos de biorremediación. Ver anexo 12.

4.3.1.2 Biodegradación bacteriana con la aplicación de plaguicidas (glifosato y Cipermetrina) en medio de cultivo líquido.

4.3.1.2.1 Ensayo crecimiento de bacterias en medio líquido con Glifosato

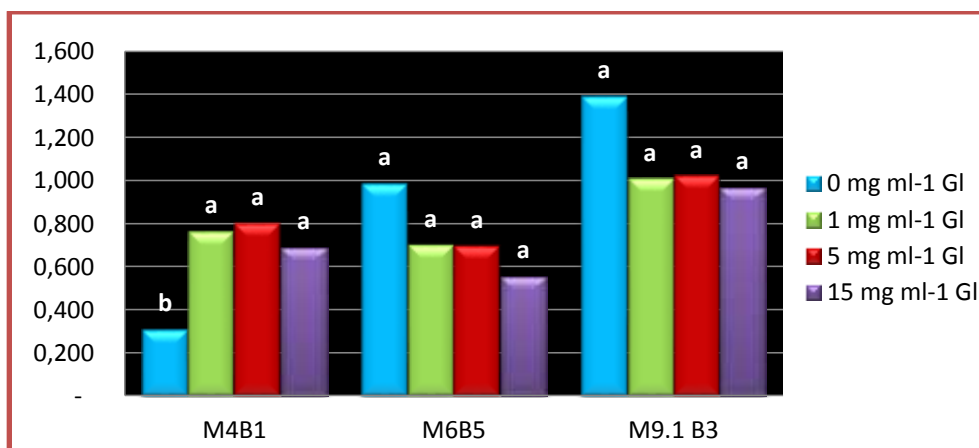


Figura 32. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en las concentraciones: 0 mg ml⁻¹ Glifosato, 1 mg ml⁻¹ Gl, 5 mg ml⁻¹ Gl y 15 mg ml⁻¹ Gl

En la figura 32 se determinó la densidad óptica de los aislamientos bacterianos en las concentraciones: 0 mg ml⁻¹ Glifosato, 1 mg ml⁻¹ Gl, 5 mg ml⁻¹ Gl y 15 mg ml⁻¹ Gl., la cepa de hongos que mayor absorbió el glifosato fue M4B1 siendo esta la primordial para procesos de biorremediación. Considerando el resto de cepas bacterianas como alternativas para la utilización en biorremediación.

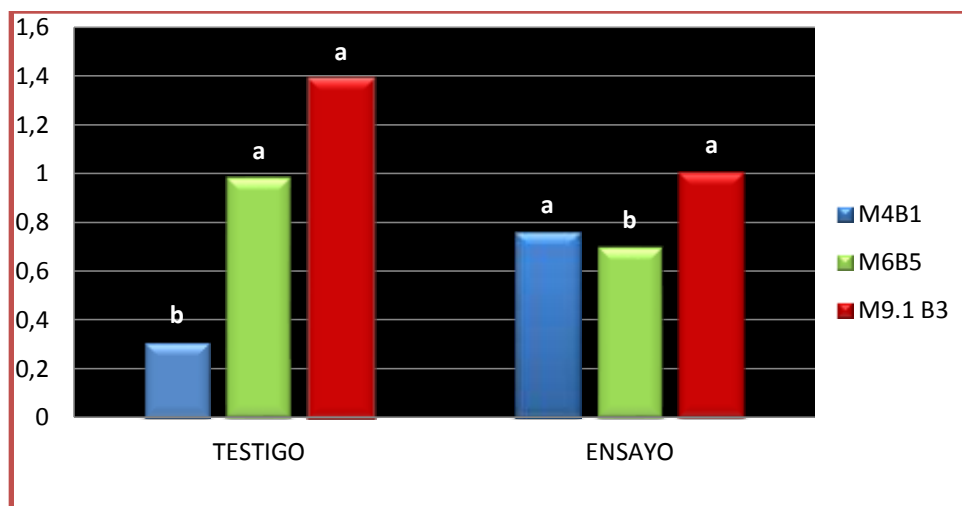


Figura 33. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en la concentración de 1g/l-1 GI

En la concentración 1g/ L-1 de glifosato se determina mayor absorción en M4B1 puesto que obtuvo un crecimiento mayor que su testigo del 59%, seguido de M9.1B3, siendo M4B1 primordial para procesos de biorremediación por su mayor absorción.

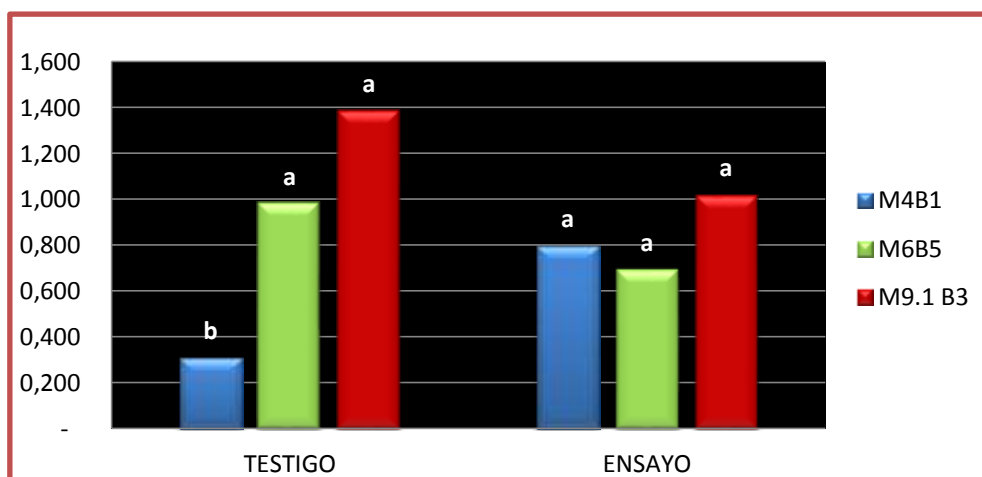


Figura 34. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en la concentración de 5 mg ml-1 GI

En la figura 34 se puede observar que la bacteria M4B1 tuvo una alta absorción del glifosato en la dosis de 5g/l ya que logro obtener un peso mayor que su testigo lo que representa el 61% del crecimiento; M6B5 inhibió el crecimiento en un 30% y M9.1B3 en 27%. La bacteria M4B1 por su alta absorción es importante tomarla en cuenta para procesos de biorremediación.

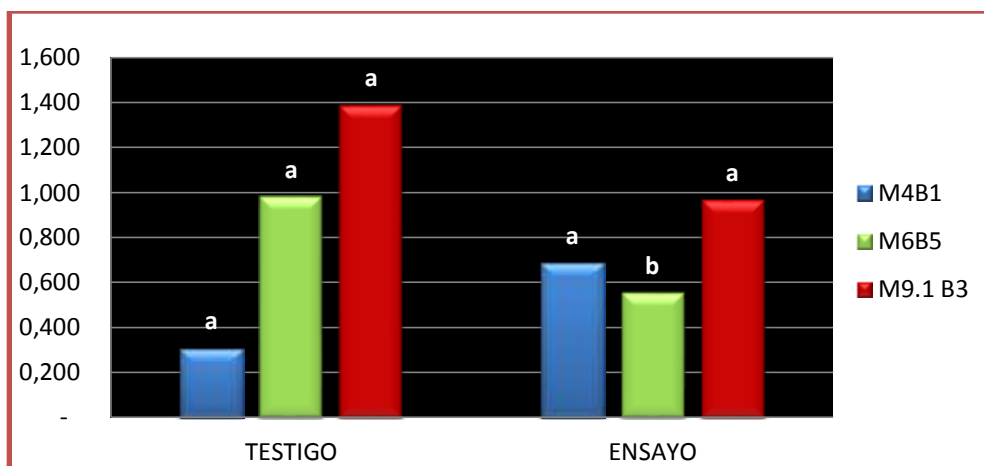


Figura 35. Densidad óptica de los aislamientos bacterianos en la concentración de 15 mg ml⁻¹ GI

La bacteria M4B1 absorbió el glifosato en la dosis de 15g/l puesto que obtuvo un crecimiento mayor que su testigo del 55%, M6B5 inhibió el crecimiento en un 44% y M9.1B3 en 30%. Por su alto grado de absorción y adaptación de la bacteria M4B1 es importante puesto que se la podría utilizar en procesos de biorremediación. Ver anexo 13.

4.3.1.2.2 Ensayo Crecimiento de bacterias en medio líquido con Cipermetrina

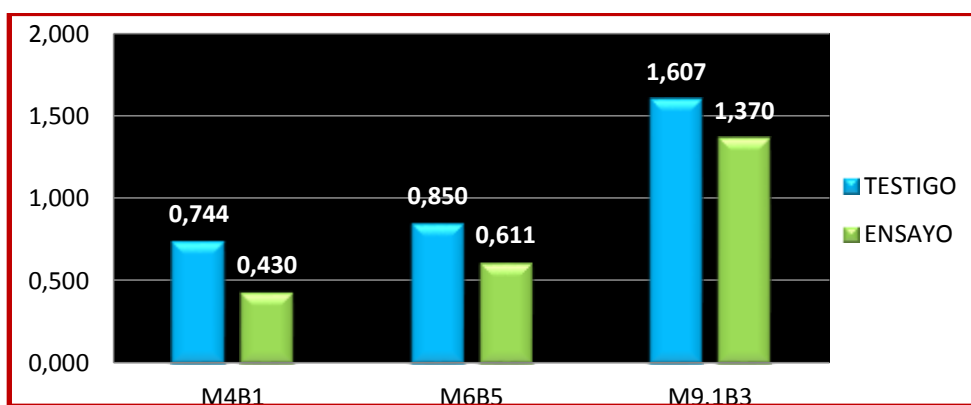


Figura 36. Inhibición del crecimiento bacteriano producido por Cipermetrina en aislados a concentración de 1g/l

En la figura 36 se determinó la densidad óptica de los aislamientos bacterianos en una concentración de 1g/l de Cipermetrina., obteniendo como resultados los siguientes: M4B1 inhibió el crecimiento en un 42%; M6B5 y M9.1B3 un 15%. Considerando a M6B5 y M9.1B3 para procesos de biorremediación y el resto de

cepas bacterianas como alternativas puesto que fueron las bacterias que mayor absorbieron la Cipermetrina en esta dosis.

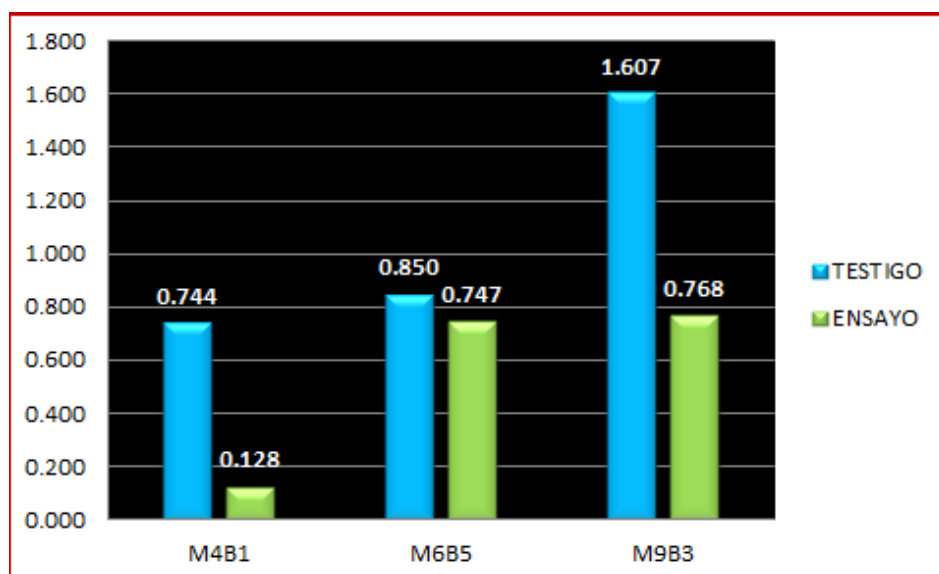


Figura 37. Inhibición del crecimiento de bacterias producida por Cipermetrina en aislados a concentración de 2g/l

En la figura 37 se determinó la densidad óptica de los aislamientos bacteriano en una concentración de 2g/l de Cipermetrina, obteniendo los siguientes resultados: M4B1 inhibió el crecimiento en un 83%; M9.1B3 con 52% y M6B5 con 12%. Considerando a M6B5 para procesos de biorremediación por su alto grado de absorción.



CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

5.1 Resultados del Primer Objetivo Específico

El cantón Pindal, se ubica a 195 kilómetros de la ciudad de Loja, caracterizándose por ser una zona productora de maíz. Actualmente el 100% de sus habitantes que se dedican a la producción agrícola, cultivan el maíz, constituyéndose en su principal actividad económica. Con la finalidad de evitar pérdidas por el ataque de plagas y enfermedades y por consiguiente mejorar la productividad, en su totalidad los agricultores aplican agroquímicos a base Glifosato y Cipermetrina.

De los testimonios recogidos en el diagnostico comunitario, se evidencio que los agricultores son conscientes del daño que causan los agroquímicos al suelo y a la salud de las personas; sin embargo, se sienten limitados en dejar de usarlos ya que el agro ecosistema se encuentra seriamente alterado, proliferando el ataque de plagas y enfermedades. Así lo afirma (Porta et al, 2003), quien sostiene que el ser humano, con objeto de proteger los cultivos frente al efecto pernicioso de múltiples organismos vivos (insectos, hongos, nematodos, malas hierbas, etc.) y aumentar la producción viene utilizando desde hace décadas productos fitosanitarios como plaguicidas, herbicidas, fungicidas y fertilizantes. Una vez aplicados, son absorbidos por las plantas o sufren procesos de adsorción, volatilización, lavado y degradación biótica y abiótica en el suelo que conducen a la formación de nuevos productos, en ocasiones más móviles, persistentes y más peligrosos que los compuestos de partida que son susceptibles de contaminar los suelos, las aguas y pasar a la cadena trófica.

En esta zona maicera, no se realizan prácticas culturales amigables con el ambiente, como es el caso de rotación de cultivos e intercalamientos. Al ser terrenos que en su mayoría son arrendados, los productores tratan de maximizar los ingresos económicos priorizando la aplicación de prácticas convencionales, sin considerar las consecuencias sociales y ambientales.



La pérdida de la cobertura vegetal, inestabilidad de taludes y erosión antropogénica y/o natural, constituyen los principales factores que generan alteraciones al suelo en la zona de Pindal. Estos factores se presentan en niveles altos, dado que el cultivo de maíz, se produce en monocultivo en grandes extensiones.

En esta zona de Pindal, se encuentra totalmente alterado el ecosistema, ya que al tratarse de un monocultivo de maíz, la cobertura vegetal se perdió en su totalidad, afectando el curso normal de las aguas, afectándose tanto en cantidad como en calidad.

Siendo el cantón Pindal el de mayor producción en la provincia de Loja, se realizó muestreos de suelos en las diferentes parroquias del cantón, con la finalidad de tener una mayor representatividad de las diferentes zonas productoras de maíz de este cantón.

M. J. Sánchez Martín M. Sánchez Camazano (1984) afirma que la humedad, temperatura, materia orgánica, tipo de arcilla, pH, intercambio iónico del suelo influyen en la persistencia y evolución de los productos químicos. Por lo tanto en las muestras M1, M2, M3 donde predominan los suelos arcillosos y en la muestra M4 donde hay suelos franco arenoso y según la EPA citada por Navia (2001), indica que el glifosato es fuertemente absorbido aún en suelos con bajos contenidos de arcillas y materia orgánica, por lo cual, aunque es altamente soluble en agua, es considerado como inmóvil o casi inmóvil. Este, permanece en las capas superiores del suelo, siendo poco propenso a la percolación y con bajo potencial de escorrentía, excepto cuando es adsorbido por material coloidal o partículas suspendidas en el agua de escorrentía.

Estudios realizados sobre la interacción del glifosato con los componentes del suelo, indican que el herbicida se inactiva rápidamente debido a su adsorción al suelo y no a una degradación química o biológica (Sprankle et al., 1975). El glifosato por tener una carga eléctrica positiva, al entrar en contacto con el suelo, cargado negativamente, es rápidamente inmovilizado y no disponible para la



absorción vía radicular. Sin embargo, existen elementos minerales que compiten por estos sitios como son el Ca, Fe y P, pudiendo formar sales con metales como Al y Fe (Comisión Científica Ecuatoriana, 2007).

5.2 Para los resultados del segundo objetivo específico

5.2.1 Unidades formadoras de colonias de bacterias

La determinación de **Unidades Formadores de Colonias de bacterias** se representaron por cinco rangos (a), (b), (bc), (cd) y (d): donde (a), (b) y (bc) representa por las muestras con altas UFC/g de suelo, mismas que se ven reflejadas en M5, M3 y M2, muestra que contienen una gran cantidad de microorganismos activos que se han vuelto resistentes a altas concentraciones de productos químicos, lo cual afecta en cantidades pequeñas a su población; como lo afirma Don Huber, científico de la USDA (2012) quien dice que algunas bacterias pueden degradar el glifosato usándolo como fuente de Carbono, Fósforo y Nitrógeno. Las cepas constituidas por (cd), presentan porcentajes medios de UFC/g de suelo mismas que se pueden evidenciar en M4 y as identificadas con (d) contienen porcentajes bajos de UFC/g de suelo esto se puede observar en M1. Las cinco muestras determinan distintos rangos tanto en altos, medios y bajos considerando que en todas las muestras hubo la presencia de microorganismos debido a que los microorganismos exhiben en general una gran adaptabilidad en respuesta al impacto causado por los xenobióticos, que es evidenciada por el restablecimiento de la actividad metabólica. Los mecanismos por los cuales esto puede suceder, involucran el reemplazamiento de especies sensibles por otras tolerantes o por una rápida recolonización del ambiente luego de la aplicación del pesticida (Frioni, 1999).

En las colonias se determinaron distintos tipos de apariencia, forma elevación y bordes según Martínez (2007) esto se debe a que las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura que aunque puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, es constante bajo condiciones controladas y depende de la especie bacteriana que la forme. Debido a que las características de las colonias



ocurren en varios grados y combinaciones dependiendo de las bacterias y son a menudo muy uniformes, sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados. Sin embargo, además de estas características se requiere también estudiar la fisiología y propiedades inmunológicas de las bacterias para poder realizar una identificación completa.

La microbiota del suelo es responsable de la ejecución y el control de funciones esenciales como la descomposición de la materia orgánica, producción de humus, reciclaje de nutrientes, flujo de energía, fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de nutrientes esenciales, como el fósforo, producción de compuestos complejos que causan la agregación del suelo, descomposición de xenobióticos y también control biológico de plagas y enfermedades (Moreira y Siquiera, 2002).

La cantidad y la diversidad de los microorganismos del suelo son extremadamente importantes en los procesos metabólicos del suelo, debido a que afectan la descomposición de la materia orgánica contribuyendo a la fertilidad del suelo (Bromilow et al., 1996; Andrea et al., 2000). La preservación de la integridad de la capacidad metabólica de la microbiota se considera un requerimiento fundamental para el mantenimiento de la calidad del suelo (Alef et al., 1995).

5.3 Para los resultados del tercer objetivo específico

En el presente estudio donde se sometieron a 3 cepas bacterianas diferentes a medio de cultivo líquido con glifosato se obtuvo como resultado que la bacteria M4B1 (*Bacilos rectangulares gram positivos*), tuvo un crecimiento mayor que su testigo del 59% en la dosis de 1g/l; 61% en 5g/l y 55% en 15gr/l. La cinética de biodegradación proporciona una evidencia del potencial de mineralización de las bacterias, siendo mayor el crecimiento en concentraciones más bajas, esto concuerda con los estudios de Grant *et al.* (2002); Jilani y Altaf (2006); Malik *et al.* (2009) y Murugesan et al. (2010).



Mientras que cuando se somete las bacterias en medio de cultivo líquido con Cipermetrina se obtiene los mejores resultados en la bacteria M6B5 (*Micrococcus gram positivo*), teniendo su mayor crecimiento en la dosis de 2g/l ya que inhibió el crecimiento en un 12% y en la dosis de 1g/l inhibió el crecimiento en 15%.

En las 6 cepas de hongos sometidos a medio de cultivo sólido con glifosato en las diferentes dosis, se tiene como resultado que M8H4 (*Mucor circinelloides* F), fue el hongo que mayormente absorbió el glifosato en la dosis de 5g/l puesto que inhibió el crecimiento en un 2%, mientras que en la dosis de 1g/l inhibió el crecimiento en un 21% y en 15g/ fue del 10%, siendo importante para los procesos de biorremediación por su buena adaptabilidad y absorción del producto químico. De igual manera en medio de cultivo líquido se obtiene los mejores resultados con M8H4 (*Mucor circinelloides* F), en la dosis de 1g/l puesto que inhibió el crecimiento en un 4% y en la dosis de 5g/l inhibió el crecimiento en 8%.

En el ensayo donde fueron sometidos los hongos a medio de cultivo sólido con Cipermetrina se tiene que el hongo M6H1 (*Penicillium chrysogenum*), tuvo un buen desarrollo durante el proceso de biodegradación, logrando un crecimiento radial superior a su testigo en un 24% en la dosis de 1gr/l. g6w; mientras tanto en medio de cultivo sólido los mejores resultados los obtuvo M6H1 (*Penicillium chrysogenum*), puesto que inhibió el crecimiento en un 0.3% en la dosis más baja de 1g/l.

El análisis de la biodegradación de los plaguicidas glifosato en concentraciones de 1g/l, 5g/l y 15/l y Cipermetrina en 1g/l y 2g/l indica que de las diferentes cepas probadas fueron M4B1 y M6B5 para bacterias y M8H4, M6H1y M6H2 para hongos, las que presentaron una mayor capacidad de biodegradación, teniendo así que M4B1 (*Bacilos rectangulares gram positivos*), tuvo una amplia capacidad para la biodegradación del glifosato y M6B5 (*Micrococcus gram positivo*) para cipermetrina. Para los hongos M8H4 (*Mucor circinelloides* F), tuvo mayor biodegradación del glifosato, mientras que M6H1 (*Penicillium chrysogenum*) y M6H2 (*Uncultured Aspergillus*) para el producto de Cipermetrina.



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- ✓ Los productores del cantón Pindal, se dedican en su totalidad a la producción de maíz, utilizando agroquímicos para la fertilización, control de plagas y enfermedades.
- ✓ Los suelos de las fincas seleccionadas del cantón Pindal son franco arcillosos en un 50%, franco arenoso 25% y arcillo limoso en un 25%, con un pH medianamente ácido en un 75%.
- ✓ Los macronutrientes y micronutrientes poseen contenidos bajos de materia orgánica, por lo que los suelos dedicados a la producción maicera en el cantón Pindal, ameritan la aplicación de prácticas de mejoramiento de fertilidad de los suelos; en el caso del potasio contiene niveles óptimos y de fósforo niveles bajos y medios.
- ✓ En el crecimiento bacteriano, los sitios que resultaron con mayores (UFC/g) de suelo, corresponden a las muestras M5, M2, M3 y en el caso de los hongos en M4 siendo estas muestras las que contienen mayor número de colonias por gramo de suelo, las mismas contienen una importante población microbiana degradadora y metabólica muy activa.
- ✓ Para la caracterización se sometieron a las bacterias por un proceso de purificación e identificación, donde se observó una amplia biodiversidad macro-morfológica y se determinó que las bacterias fueron gram-positivas en un 56%, con agrupaciones: el 55% bacillus, 28% cocos y micrococos en un 17%.
- ✓ La identificación molecular de hongos se realizó por gDNA extracción, amplificación y secuenciación de los genes 18S rRNA, identificándose ocho géneros: *Penicillium*, *Mucor*, *Scytalidium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Eurotiomycetes*, *Talaromyces* y *Fusarium*.



- ✓ **En el caso de Hongos:** *Mucor circinelloides* F., constituye el de mayor capacidad de adaptabilidad y absorción para glifosato en dosificaciones de 5g/l y 1g/l. Mientras que, *Penicillium chrysogenum* y *Uncultured Aspergillus*, constituyen los de mayor capacidad de absorción para cipermetrina.

- ✓ **En el caso de Bacterias:** *Bacilos rectangulares gram positivos*, tuvo un crecimiento del 59 % mayor que su testigo en dosis de 1g/l; 61% en 5g/l y 55% en 15gr/l. Mientras que medio de cultivo líquido con cipermertrina, *Micrococcus gram positivo*, presenta mayor crecimiento en dosificaciones de 2 g/l y 1g/l.



6.2 Recomendaciones

- ✓ El suelo constituye un recurso natural que desempeña diversas funciones en la superficie de la Tierra, proporcionando soporte mecánico, así como nutrientes para el crecimiento de plantas y micro-organismos por tal razón se recomienda aplicar procesos de biorremediación para disminuir el grado de contaminación.
- ✓ Conociendo que existen concentraciones elevadas de los agroquímicos glifosato y cipermetrina altamente tóxicos, es necesario aplicar una técnica de biorremediación del suelo, para disminuir el grado de contaminación, es por ello que se recomienda aplicar las bacterias M4B1y M6B5 y hongos M8H4 para el caso del glifosato y M6H1y M6H2 para Cipermetrina, que fueron los que mayor absorbieron y toleraron las dosis aplicadas de glifosato (1g/l, 5g/l y 15g/l) y cipermetrina (1g/l y 2g/l).
- ✓ Analizar los suelos en lugares aledaños al cantón Pindal para conocer el impacto de la aplicación de los agroquímicos en los cultivos de maíz.
- ✓ Teniendo en cuenta que se desconoce la situación actual de acumulación de sustancias xenobióticas provenientes de agroquímicos en suelos agrícolas dedicados a la producción de monocultivos de maíz en la provincia de Loja, constituye de fundamental importancia realizar una socialización de los resultados obtenidos a los productores de maíz del cantón Pindal.
- ✓ Continuar con esta investigación con procesos de biorremediación en condiciones de campo, en base a los microorganismos identificados con mayor potencial de degradación de contaminantes.



CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexander, M. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. Editorial AGT. México, D.F, pags. 114.
- Arboleda, V., & Bravo, V. (2008). *Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos de la Central Hidroeléctrica del campamento Secoya mediante Landfarming*. Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Recuperado el 19 de Noviembre de 2015
- Atlas R.; Unterman, R. 1999. Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd ed, ASM Press, Washington D.C. 666-681p.
- (BIOETICA, (2015). Biorremediación. Recuperado el 15 de 11 de 2015, de <http://bioeticaycmc.blogspot.com/2015/01/biorremedacion.html>
- Camino, M., & Aparicio, V. (2010). *Aspectos Ambientales de uso del glifosato*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Recuperado el 7 de 11 de 2015, de <http://inta.gob.ar/documentos/aspectos-ambientales-del-uso-del-glifosato>
- Castrejón, M. (2014). Caracterización e identificación de consorcios bacterianos capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados. Facultad de Ciencias Biológicas y Laboratorio de Investigaciones Ambientales. Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad No 1001 col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, C.P.
- Comunidad Andina. (2011). Agricultura Familiar Agroecológica Campesina en La Comunidad Andina. Lima, Perú. 93p. Cordero, D., & Sánchez, F. (s.f). *RAP-AL URUGUAY*. Recuperado el 2015 de Noviembre de 15, de <http://webs.chasque.net/~rapaluy1/glifosato/Regulaciones.html>
- Childhood Pesticides Poisoning: Information for Advocacy and Action”, UNEP Chemicals, May 2004.



- Christon J. Hurst., et al. (2002). Manual of Environmental Microbiology. Second Edition. ASM Press, Washington, D.C., páginas 3-5.
- FAO, O. d. (2015). Obtenido de <http://www.fao.org/soils-portal/levantamiento-de-suelos/propiedades-del-suelo/propiedades-quimicas/es/>
- Fournier, D., Halasz, A., Spain, J., Fiurasek, P. y Hawari. J. 2002. Determination of key metabolites during biodegradation of hexahidro 1,3,5 Trinitro 1,3,5 Triazine with *Rhodococcus* sp Strain DN 22. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 166-172.
- Forero, R. 2014. Agricultura y ganadería tropical. Memorias del curso Agricultura y Ganadería Tropical. IICA. Bogotá, 34 p.
- Galli, C. 2002. Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos. Comisión Técnica Asesora en: Ambiente y desarrollo sostenible, Buenos Aires, Argentina.
- Gallo, G., & Iñiguez, K. (2010). *Agroquímicos. ¿Por qué los agroquímicos se transforman en agro tóxicos?* Buenos Aires: Fundación Patagonia Tercer Milenio. Recuperado el 15 de 11 de 2015
- Glazer, A.; Nikaido, H. 1995. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Gobierno Provincial de Loja. 2011. Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la provincia de Loja. Loja, Ecuador.
- Golovleva, L., Aharonson, R., Greenhalg, N., Sethunathan, N. y Vonk, W. 1990. The role and limitations of microorganism in the conversion of xenobiotics. *Pure and applied Chemistry* 62: 351-364.
- Guijarro, R., Barasona, M., López, M., Ferri, M., & Tello, J. (2002). *Jardineros* (Primera ed.). España: MAD, S.L. Recuperado el 12 de Octubre de 2016, de <https://books.google.com.ec/books?id=IQHVCoCgbsEC&pg=SL26130PA39&dq=que+es+potencial+de+hidrogeno+del+suelo&hl=es&sa=X&ved>



=0ahUKEwj6w5KJtefPAhXEqB4KHdQVAWoQ6AEIJzAD#v=onepage&q=qu e%20es%20potencial%20de%20hidrogeno%20del%20suelo&f=true

Hartemink, A. E. 2016. World soils book series. Ed. Springer. USA. ISBN: 2211-1255. 285 p.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. 2015. http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014-2015/2015/2015/Presentacion%20de%20resultados%20ESPAC_2015.pdf

Jerez, C. 2009. Metal Extraction and Biomining. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Oxford: Academic Press 407-420 p.

Kästner, M. 2000. Humification: process or formation of refractory soil organic matter. En J. Klein (Ed), Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination. Wiley-VCH. Weinheim. pp. 89-126

Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A. y Santas, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and comercial microorganisms currently used. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 677-686p.

Kniss, A.R., Coburn, C.W., 2015. Quantitative Evaluation of the Environmental Impact Quotient (EIQ) for Comparing Herbicides. PLoS One 10, e0131200.

Magdoff, F., Van Es, H. 2009. Building Soils for Better Crops. Sustainable Soil Management. Ed. Sustainable Agriculture Research and Education (SARE). U.S. Department of Agriculture. USA. ISBN 978-1-888626-13-1. 310 p.

Martínez et al (2012). *Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de roundup sl®* (Recuperado el 16 – 03 – 2016 en: <file:///C:/Users/Satellite/Desktop/LITERATURA/TOLERANCIA%20Y%20DEGRADACION%20DEL%20GLIFOSATO%20POR%20BACTERIAS%20AISLADAS%20DE%20SUELOS%20CON%20APLICACIONES%20FRECU>



ENTES%20DE%20ROUNDUP%20SL%C2%AE%20(PDF%20Download%20Available).html.

Ministerio del Ambiente. 2012. Línea base de los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en la matriz aire del Ecuador. Dirección Nacional de Control Ambiental, Quito, Ec., 11p.

Ministerio del Ambiente, (2015). Acuerdo Ministerial N° 028. En M. d. ambiente, ANEXO 2 DEL LIBRO VI DEL TEXTO (pág. 13). Quito.

Monteros, A. y Salvador, S. 2015. Panorama agroeconómico del Ecuador una visión del 2015. Ed. Dirección de Análisis y Procesamiento de la Información Coordinación General del Sistema de Información Nacional Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Ecuador. 16 p.

Nannipieri, P., Kandeler, E. & Ruggiero, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Enzymes in the Environment (eds R.G. Burns & R. Dick), pp. 1–33. Marcel Dekker, New York.

Nannipieri, P. and Badalucco, L. 2003. Processes in the Soil–Plant System: Modelling Concepts and Applications. European Journal of Soil Science. 54: (4): 655–670.

Ortiz, M.; Sánchez, E.; Vázquez, R.; Quintero, R. 1997. Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. Biotecnología 2(3): 129-151p.

Pietramellara, G., Dal Canto, L., Vettori, C., Gallori, E. and Nannipieri, P. 1997. Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of dna bound on clay minerals. Soil biology and biochemistry, 29, 55–61.

PRATEC (Proyecto Andino de Tecnologías Campesinas) - Martin Perez 866, Lima 17, PERU - Tel (FAX): 2612825 - Perú - www.pratec.org.pe/ - pratec (@) pratec.org.pe

Porta, J., López-Acevedo, M. y Roquero, C. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 960 pp.



- Ramón Fuentes, C. (2007). *Agrosistemas sostenibles y ecológicos*. Galicia, España. Recuperado el 09 de Enero de 2016, de https://books.google.com.ec/books?id=oHtVPwP1vpsC&pg=PA36&dq=definicion+de+sostenibilidad+del+suelo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjioPPRpq_KAhXBeD4KHbkaBygQ6AEIHjAB#v=onepage&q=definicion%20de%20sostenibilidad%20del%20suelo&f=true
- Riley, P., Cotter, J., Contiero, M., & Watts, M. (2011). *Tolerancia a herbicidas y cultivos transgénicos*. Organización GREENPEACE. Buenos Aires: Greenpeace International, Greenpeace Research Laboratories y GM Freeze. Recuperado el 15 de Noviembre de 2015, de <http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2011/bosques/informe-glifosato-espa%C3%B1ol-v2.pdf>
- Rosas, M. E. (2012). *Movilidad del Glifosato en el suelo, agua de escurrimiento, persistencia y daño en el tejido vegetal del sistema de cultivo paso-maíz, en Sucumbíos*. Tesis universitario, Universidad Técnica del Norte, Ibarra. Recuperado el 14 de Noviembre de 2015, de <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1976/1/RNR%2520155%2520TESIS.pdf>
- Rueda, G.; Rodríguez, J.; Molina, R. 2011. Metodologías para establecer valores de referencia de metales pesados en suelos agrícolas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 11p.
- Salazar, N. J., & Aldana, M. L. (2011). Herbicida Glifosato: Usos, Toxicidad y Regulación. *Biotecnia*, 23-27. Recuperado el 4 de Julio de 2015, de <http://www.biocetnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-04.pdf>
- Silva, S. M., & Correa, F. J. (2009). *Análisis de la contaminación del suelo: Revisión de la normativa y posibilidades de la regulación económica*. Tesis magistral, Universidad de Medellín, Medellín. Recuperado el 14 de Noviembre de 2015, de <http://www.redalyc.org/pdf/1650/165013122001.pdf>



- Stotzky, G. 1997. Soil as an environment for microbial life. In: Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York. pp. 1–20.
- Torres, R. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Ecosistemas. (En línea). Disponible en <http://www.aeet.org/ecosistemas/032/informe1.htm>. Consultado en marzo. 2016.
- Torsvik, V.L., Sørheim, R. & Goksoyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. Journal of Industrial Microbiology, 17, 170–178.
- Umrana, V. 2006. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. Bioresource Technology 97(10): 1237-1242.
- Vásquez, M. y Reyes, W. 2002. Degradación de Aroclor 1242 por *Pseudomonas* sp. Biblioteca Nacional del Perú, Perú.
- United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, 2009. Irrigation Guide. Soils Chapter Two. Reference Subjects – Engineering. North Dakota, USA. pp. 5.



7 ANEXOS

Anexo 1. Formato de encuesta.

1. Localidad: _____
2. Georeferenciación: _____
3. Cultivos que siembra el agricultor: _____
1 _____, 2 _____, 3 _____, 4 _____
4. Cultivo principal: _____
5. Hace rotación de cultivos: SI _____ NO _____
a) ¿Cuales? _____
6. Ha realizado intercalamiento de cultivos: _____
a) ¿Cuáles? _____
b) ¿Por qué? _____
7. Alteraciones al suelo:
a) Importante pérdida de cobertura vegetal: SI _____ NO _____
b) Clara inestabilidad de talud: SI _____ NO _____
c) Evidencia de erosión antropogénica: SI _____ NO _____
d) Evidencia de erosión natural: SI _____ NO _____
e) Mínima intervención del suelo: SI _____ NO _____
8. Alteraciones a las aguas:
a) Importante alteraciones de fuentes y drenajes superficiales: SI _____ NO _____
b) Generación de vertidos: SI _____ NO _____
c) Contaminación por materia orgánica de drenajes menores: SI _____ NO _____
d) Desviación del curso de fuentes y drenajes menores (riachuelos): SI _____ NO _____
9. Alteraciones al aire:
a) Generación de olores a sustancias químicas: SI _____ NO _____
b) Emisión de gases: SI _____ NO _____
c) Generación de ruidos: SI _____ NO _____
d) Generación de partículas y polvos: SI _____ NO _____
10. Aplica fertilizantes químicos: SI _____ NO _____
a) ¿Cuales? _____
11. Usa medios de protección a la hora de aplicación: SI _____ NO _____
12. Aplica fertilizantes orgánicos o biofertilizantes: SI _____ NO _____
a) ¿Cuales? _____
13. Aplica productos químicos para combatir plagas y enfermedades: SI _____ NO _____
a) ¿Cuales? _____
14. Aplica productos biológicos para controlar plagas y enfermedades: SI _____ NO _____
a) ¿Cuales? _____
15. Conoce los perjuicios que ocasiona la aplicación de productos químicos: SI _____ NO _____
16. Posee algún tipo de padecimiento a la salud: SI _____ NO _____
Padecimiento: _____ Congénito: _____ Adquirido: _____
Padecimiento: _____ Congénito: _____ Adquirido: _____
Padecimiento: _____ Congénito: _____ Adquirido: _____
Padecimiento: _____ Congénito: _____ Adquirido: _____
Padecimiento: _____ Congénito: _____ Adquirido: _____



Anexo 2. Resultados e interpretación de análisis de suelo.

RESULTADOS ANÁLISIS DE SUELO										
COD. LAB.	CÓD. CAM.	ANÁLISIS MECÁNICO % TFSA			TEXTURA	Ph	CE	M.O	P205	K20
		Ao	Lo	Ac			mmhos/cm	%	ppm	pmm
1674	1 (ABC)	25,2	37,8	37	FoAC	6.18	0.219	3,10	36,67	65,63
1675	2 (DEF)	19,2	41,8	39	FoAcLo	5.67	0.249	4,61	14,66	34,79
1676	3 (GHI)	17,2	41,8	41	AcLo	5.7	0.179	3,97	59,64	105,26
1677	4 (SKL)	61,2	23,8	15	FoAo	5.62	0.165	3,60	40,81	13,01

INTERPRETACIÓN DE ANÁLISIS DE SUELO							
COD. LAB.	CÓD. CAM.	TEXTURA	pH	CE	M.O	P205	K20
				mmhos/cm	%	ppm	pmm
1674	1 (ABC)	Franco Arcilloso	Ligeramente Ácido	No salino	Medio	Medio	Bajo
1675	2 (DEF)	Franco Arcillo Limoso	Medianamente Ácido	No salino	Medio	Bajo	Bajo
1676	3 (GHI)	Arcillo Limoso	Medianamente Ácido	No salino	Medio	Alto	Medio
1677	4 (SKL)	Franco Arenoso	Medianamente Ácido	No salino	Medio	Medio	Bajo

Anexo 3. Rangos de interpretación (Iñiguez, 2010).

PARÁMETRO	ACUERDO MINISTERIAL 028	RANGOS DE INTERPRETACIÓN				
		Nutrimiento	Unidad	Bajo Mínimo	Medio Optimo	Alto Máximo
Textura		=	=	=	=	=
Ph	6 - 8	=	=	=	=	=
Conductividad Eléctrica	0.2	=	=	=	=	=
MO	%	MO	%	2 - 4	4.4 - 6	6.1 - 8
N	Ppm	N	Ppm	20 - 40	40.1 - 60	60.1 - 80
P205	Ppm	P205	Ppm	10 - 20	20.1 - 30	30.1 - 40
K20	Ppm	K20	Ppm	50-100	100.1 - 150	150.1 - 200

Anexo 4. Conteo de colonias bacterianas

	Placas	M1	M2	M3	M4	M5
(10)-5	1	17	12	160	425	426
	2	46	27	85	165	105
	3	28	14	254	191	342
	4	41	32	115	436	196
	X	33	21.25	153.5	304.25	267.25
Nºm.o g/s		3.30E+06	2.13E+06	1.54E+07	3.04E+07	2.67E+07
(10)-6	1	9	96	262	148	328

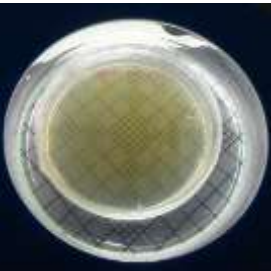


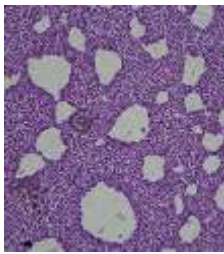
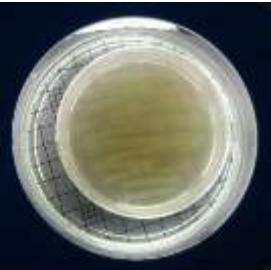








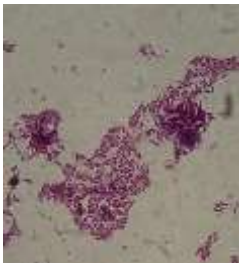
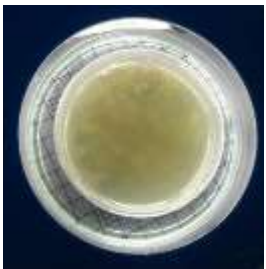



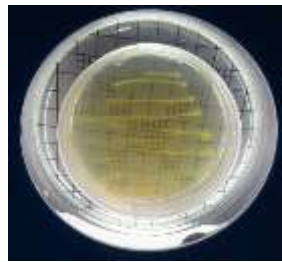

	2	7	156	400	147	340
	3	3	187	369	118	268
	4	4	173	273	167	179
	X	5.75	153	326	145	278.75
N°m.o g/s		5.75E+06	1.53E+08	3.26E+08	1.45E+08	2.79E+08
(10)-7	1	4	98	166	23	340
	2	2	115	172	25	331
	3	1	133	289	26	340
	4	0	98	87	35	421
	X	1.75	111	178.5	27.25	358
N°m.o g/s		1.75E+07	1.11E+09	1.79E+09	2.73E+08	3.58E+09

Anexo 5. Conteo de colonias de hongos.


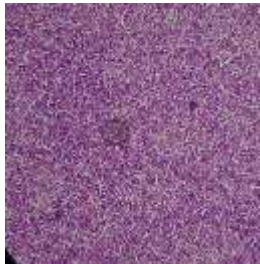

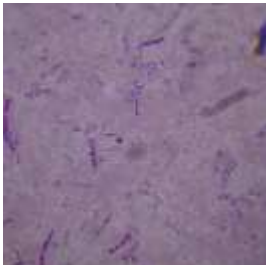
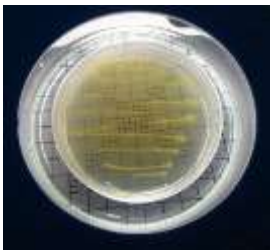
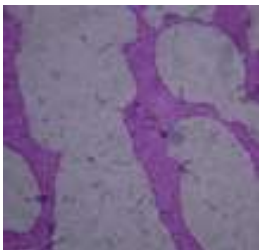
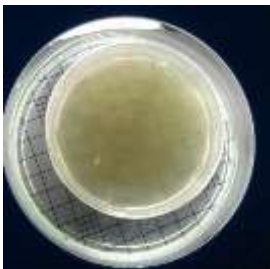



	Placas	M1	M2	M3	M4	M5
(10)-3	1	10	8	16	13	28
	2	5	8	11	14	25
	3	9	5	12	18	2
	4	7	8	11	12	0
	X	7.75	7.25	12.5	14.25	13.75
N°m.o g/s		7.75E+03	7.25E+03	1.25E+04	1.43E+04	1.38E+04
(10)-4	1	6	2	3	1	3
	2	0	4	2	2	6
	3	1	3	2	3	20
	4	1	8	3	2	24
	X	2	4.25	2.5	2	13.25
N°m.o g/s		2.00E+04	4.25E+04	2.50E+04	2.00E+04	1.33E+05
(10)-5	1	1	1	0	4	4
	2	1	0	0	7	5
	3	1	2	0	1	3
	4	0	1	0	1	6
	X	0.75	1	0	3.25	4.5
N°m.o g/s		7.50E+04	1.00E+05	0.00E+00	3.25E+05	4.50E+05

Anexo 6. Resultados de la prueba de tinción de Gram en Bacterias

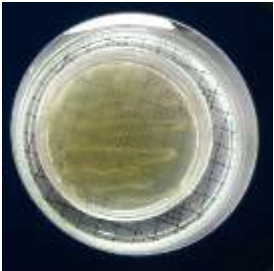


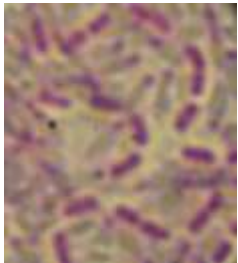

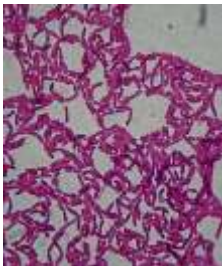
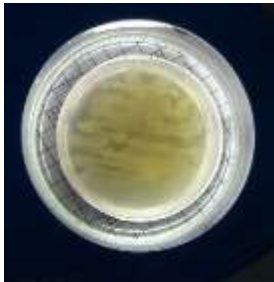



CODIGO	FOTOGRAFIA CAJA	CARACTERISTICAS FENOTIPICAS	FOTO MICROSCOPIO	CARACTERSTICAS
M1B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color Blanco • Crecimiento abundante 		Micrococcos gram negativos agrupados en racimos
M1B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color Blanco • Crecimiento ligero 		Cocos gram positivos agrupados en racimos
M1B3		<ul style="list-style-type: none"> • Color Blanco • Crecimiento abundante 		Bacilos largos gram positivos agrupados en cadenas
M1B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color Blanco • Crecimiento abundante 		Bacilos cortos gran positivos agrupados en racimos



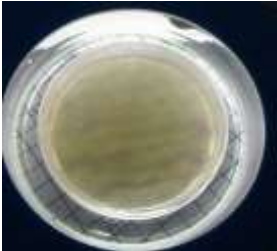
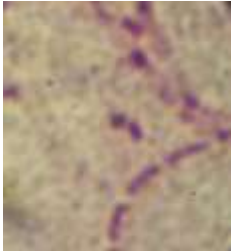
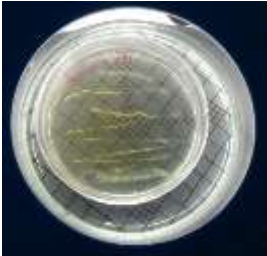
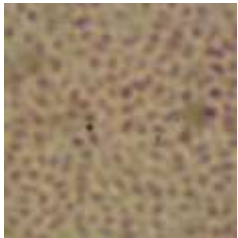
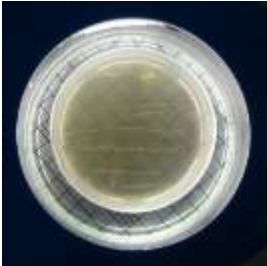

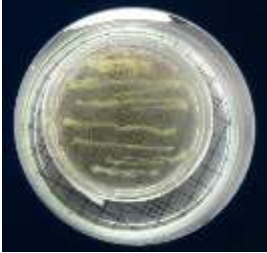

M1B5		<ul style="list-style-type: none"> • Color Beige • Crecimiento abundante 		Bacilos cortos gram negativos agrupados en racimos
M1B6		<ul style="list-style-type: none"> • Color Naranja • Crecimiento ligero 		Bacilos largos gram positivos agrupados en racimos
M2B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento ligero 		Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en racimos
M3B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento ligero 		Bacilos cortos gram positivos agrupados en racimos
M3B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color naranja • Crecimiento ligero 		Micrococcos gram negativos agrupados en racimos

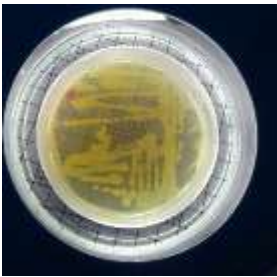
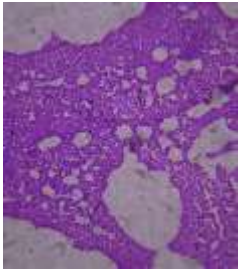
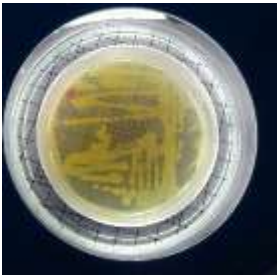
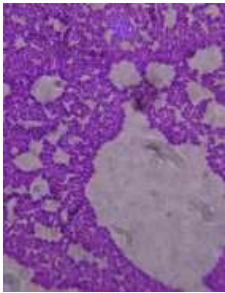

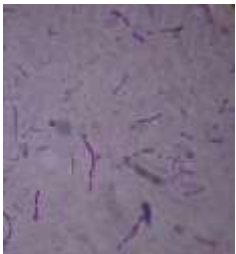


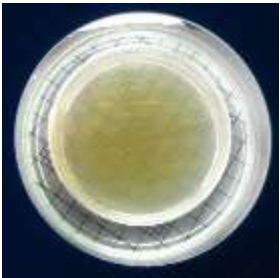





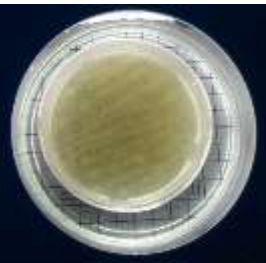

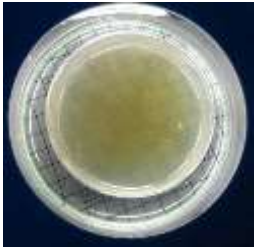





M3B3		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento ligero 		Bacilos largos gram positivos agrupados en racimos
M4B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento abundante 		Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadenas, esporulados
M4B3		<ul style="list-style-type: none"> • Color naranja • Crecimiento ligero 		Cocos gram negativos agrupados en racimos
M4B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento abundante 		Bacilos cortos gram negativos agrupados en cadenas
M4B6		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento ligero 		Cocos gram positivos agrupados en racimos






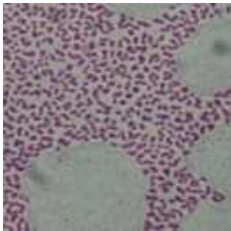
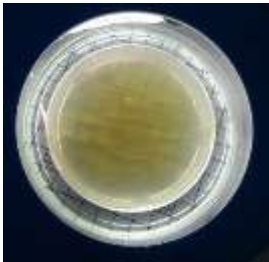

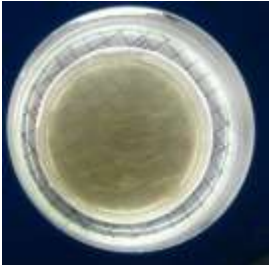


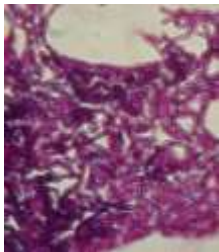
M6B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento ligero 		Micrococcos gram negativos agrupados en cadenas
M6B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento abundante 		Bacilos cortos gram negativos agrupados en cadenas
M6B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento abundante 		Bacilos largos gram positivos agrupados en racimos
M6B6		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • crecimiento abundante 		Bacilos largos gram negativos esporulados
M7B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • crecimiento ligero 		Bacilos cortos gram positivos agrupados

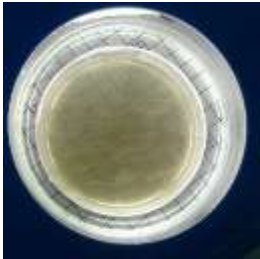

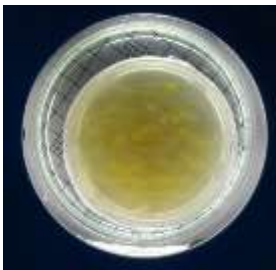
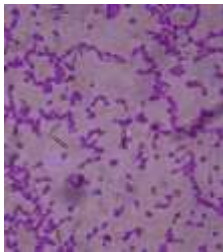


M7B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • crecimiento ligero 		Bacilos cortos gram positivos agrupados
M7B3		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • crecimiento abundante 		Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadenas.
M7B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • crecimiento ligero 		Cocos gram negativos agrupados en cadenas
M7B5		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • crecimiento abundante 		Bacilos largos gram negativos agrupados en cadenas, esporulados
M7B7		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • crecimiento abundante 		Cocos gram positivos agrupados

M8B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • crecimiento ligero 		Cocos gram positivos agrupados en racimos
M8B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • crecimiento ligero 		Cocos gram positivos agrupados en racimos
M8B3		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • crecimiento ligero 		Bacilos largos gram positivos agrupados en cadenas
M8B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • crecimiento ligero 		Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadenas
M9.1B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento ligero 		Cocos gran negativos agrupados en racimos

M9.1B3		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • Crecimiento abundante 		Cocos gran positivos agrupados en racimos
M9.1B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento abundante 		Bacilos largos gram negativos agrupados en cadenas
M9.1B5		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento abundante 		Bacilos cortos gram negativos agrupados
M9.2B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento ligero 		Bacilos gram positivos agrupados en cadenas
M9.2B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • Crecimiento ligero 		Micrococos gram positivos agrupados en cadena



M9.2B3		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento ligero 		Micrococos gram negativos agrupados en cadenas
M9.2B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento ligero 		Micrococos gram positivos agrupados en racimos
M9.2B5		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento abundante 		Micrococos gram positivos agrupados en racimos
M9.2B6		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento abundante 		Cocos gram positivos agrupados en racimos
M10B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • Crecimiento abundante 		Bacilos largos gram positivos agrupados en cadenas

M10B2		<ul style="list-style-type: none"> • Color blanco • Crecimiento abundante 		Bacilos rectangulares gram positivos agrupados en cadenas
M10B4		<ul style="list-style-type: none"> • Color amarillo • Crecimiento ligero 		Cocos gram negativos agrupados en racimos
M11B1		<ul style="list-style-type: none"> • Color beige • Crecimiento ligero 		Cocos gram negativos agrupados en racimos

Anexo 7. Identificación genética de hongos.

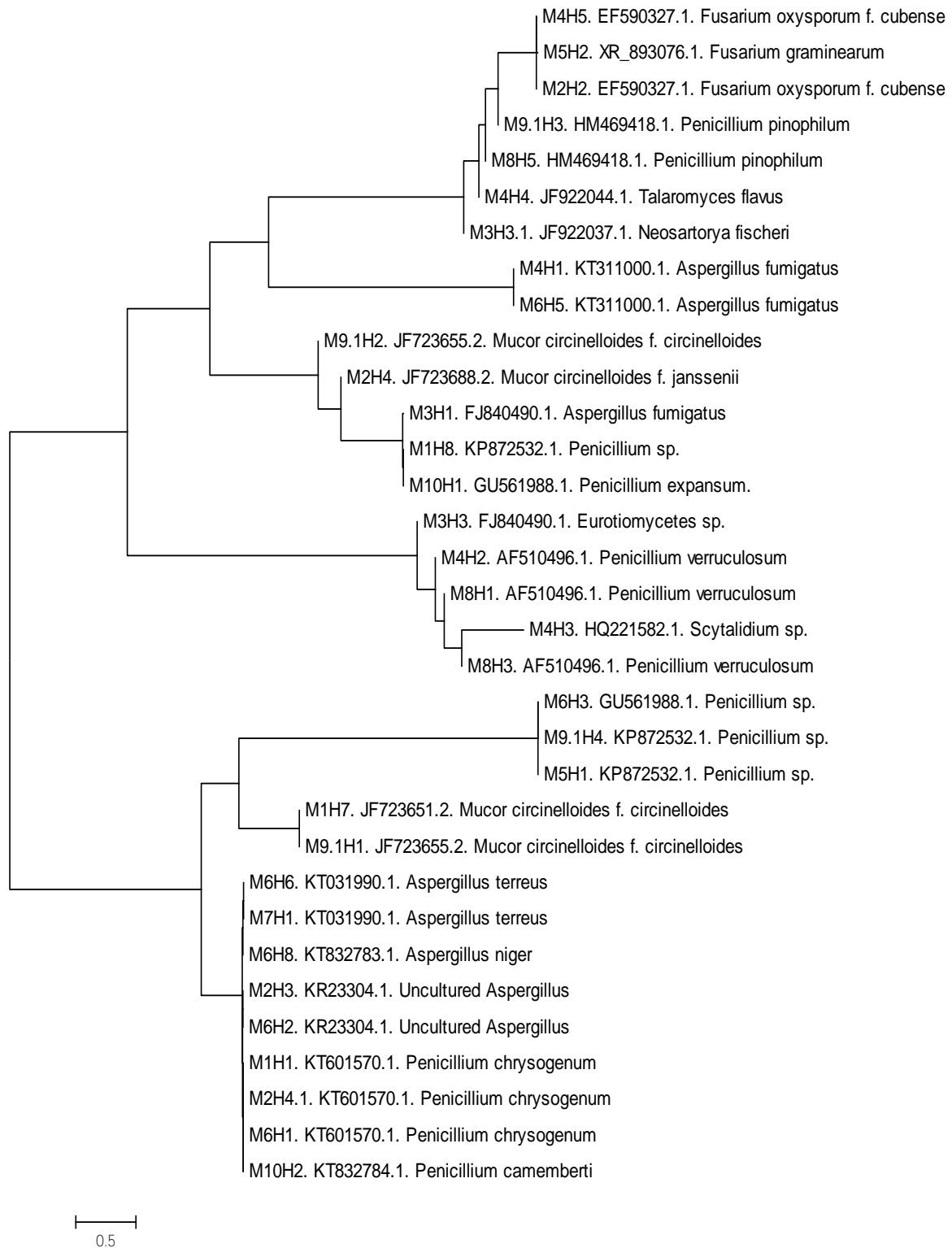
Aislado	Localidad	FASTA más cercana	N° Accesoión	% de identidad
H1M1		<i>Penicillium chrysogenum</i> aislado F1	KT601570.1	99
M1H7		<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> cepa LMSA 1.09.183	JF723651.2	99
M1H8		<i>Penicillium</i> sp. Y32	KP872532.1	100
M2H2		<i>Scytalidium</i> sp. YG-2010b strain HSAUP061127	HQ221582.1	98
M2H3		Uncultured <i>Aspergillus</i> clone GRP13	KR233004.1	99
M2H4		<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i> cepa CBS 205.68	JF723688.2	97
M2H4.1		<i>Penicillium chrysogenum</i> aislado F1	KT601570.1	99
M3H1		<i>Aspergillus fumigatus</i> cepa FS160	FJ840490.1	99
M3H3.1		<i>Neosartorya fischeri</i> cepa CBS544.65	JF922037.1	99
M3H3		<i>Eurotiomycetes</i> sp. Genotipo 167	KP115819.1	98
M4H1		<i>Aspergillus fumigatus</i> cepa MSEF106	KT311000.1	99
M4H2		<i>Penicillium verruculosum</i>	AF510496.1	99



M4H3		<i>Scytalidium</i> sp. YG-2010b cepa HSAUP061127	HQ221582.1	99
M4H4		<i>Talaromyces flavus</i> cepa CBS310.38	JF922044.1	99
M4H5		<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> cepa ATCC 96285	EF590327.1	98
M5H1		<i>Penicillium</i> sp. Y32	KP872532.1	100
M5H2		<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	XR_893076.1	98
M6H1		<i>Penicillium chrysogenum</i> aislado F1	KT601570.1	99
M6H2		Uncultured <i>Aspergillus</i> clon GRP13	KR233004.1	99
M6H3		<i>Penicillium</i> sp. Y32	KP872532.1	100
M6H4		<i>Aspergillus fumigatus</i> cepa MSEF106	KT311000.1	98
M6H5		<i>Aspergillus fumigatus</i> cepa MSEF106	KT311000.1	98
M6H6		<i>Aspergillus terreus</i> cepa VV08	KT031990.1	99
M6H8		<i>Aspergillus niger</i> cepa ISSFR-012	KT832783.1	97
M7H1		<i>Aspergillus terreus</i> cepa VV08	KT031990.1	99
M8H1		<i>Penicillium verruculosum</i>	AF510496.1	99
M8H3		<i>Penicillium verruculosum</i>	AF510496.1	99
M8H4		<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> cepa LMSA 1.09.192	JF723655.2	98
M8H5		<i>Penicillium pinophilum</i> cepa KUC1758	HM469418.1	98
M9.1H1		<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> cepa LMSA 1.09.192	JF723655.2	98
M9.1H2		<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> cepa LMSA 1.09.192	JF723655.2	98
M9.1H3		<i>Penicillium pinophilum</i> cepa KUC1758	HM469418.1	98
M9.1H4		<i>Penicillium</i> sp. Y32	KP872532.1	100
M10H1		<i>Penicillium</i> sp. I09F-484	JX134614.1	99
M10H2		<i>Penicillium camemberti</i> cepa ISSFR-016	KT832784.1	98



Anexo 8. Dendograma del agrupamiento de aislados de hongos.





Anexo 9. Crecimiento radial de hongos en medio de cultivo solido con glifosato en las dosis (1g/l, 5g/l y 15g/l).

ENSAYO CON GLIFOSATO																															
TESTIGO																ENSAYO															
HONGO	REPETICIONES	DOSIS												DOSIS																	
		1ml				5ml				15ml				1ml				5ml				15ml									
		1° día	2° día	3° día	4° día	1° día	2° día	3° día	4° día	1° día	2° día	3° día	4° día	1° día	2° día	3° día	4° día	1° día	2° día	3° día	4° día	1° día	2° día	3° día	4° día	1° día	2° día	3° día	4° día		
M6H4	1	1,80	2,40	2,90	3,60	1,60	2,30	2,70	4,10	1,30	1,90	2,30	2,70	1,70	2,20	3,10	3,50	2,30	2,60	3,70	4,10	0,90	1,10	1,50	1,70						
	2	2,00	2,80	3,00	3,50	1,70	2,20	2,80	3,50	1,50	2,10	2,70	3,70	1,70	1,90	2,70	3,50	1,50	1,80	2,80	4,10	1,30	2,10	2,50	2,90						
	3	1,60	2,20	2,80	3,20	1,80	2,10	2,70	3,30	1,50	2,10	2,50	2,80	1,60	2,50	2,90	3,60	1,30	1,70	2,10	2,30	1,10	1,60	1,90	2,20						
promedio		1,80	2,47	2,90	3,43	1,70	2,20	2,73	3,63	1,43	2,03	2,50	3,07	1,67	2,20	2,90	3,53	1,70	2,03	2,87	3,50	1,10	1,60	1,97	2,27						
promedio General		2,65				2,57				2,26				2,58				2,53				1,73									
M6H1	1	3,00	3,50	3,80	4,00	1,40	1,60	2,80	4,00	1,70	1,90	2,20	2,30	1,70	2,50	3,10	3,10	1,30	1,70	3,00	4,10	0,50	0,70	0,90	0,90						
	2	3,50	3,70	3,80	4,10	1,60	2,20	2,50	2,70	2,30	3,00	3,30	4,20	1,60	2,40	2,70	2,90	1,30	3,50	3,70	4,00	1,70	2,00	3,00	3,70						
	3	2,80	3,00	3,80	4,40	1,40	1,70	2,20	4,00	2,90	3,30	3,70	4,30	1,60	2,60	2,90	3,50	1,20	1,70	3,70	4,00	1,70	2,30	2,90	3,00						
promedio		3,10	3,40	3,80	4,17	1,47	1,83	2,50	3,57	2,30	2,73	3,07	3,60	1,63	2,50	2,90	3,17	1,27	2,30	3,47	4,03	1,30	1,67	2,27	2,53						
promedio General		3,62				2,34				2,93				2,55				2,77				1,94									
M6H1	1	3,00	3,50	3,90	4,30	2,20	2,50	3,30	4,40	2,00	2,90	3,20	4,00	1,90	2,40	2,80	3,40	1,80	2,50	3,10	4,20	0,00	0,00	0,00	0,00						
	2	2,10	3,10	3,90	4,10	2,00	2,90	3,40	4,40	1,50	2,00	2,90	4,30	3,10	3,40	3,60	3,80	1,50	2,20	3,10	4,00	1,20	1,60	2,10	3,20						
	3	2,60	3,40	3,90	4,50	1,90	2,70	3,40	4,10	2,50	3,10	3,90	4,40	3,40	3,60	3,60	3,70	1,70	2,10	3,50	4,20	2,10	2,70	3,10	3,00						
promedio		2,57	3,33	3,90	4,30	2,03	2,70	3,37	4,30	2,00	2,67	3,33	4,23	2,80	3,13	3,33	3,63	1,67	2,27	3,23	4,13	1,10	1,43	1,73	2,07						
promedio General		3,53				3,10				3,06				3,23				2,83				1,58									
M6H2	1	2,80	3,50	3,90	4,40	2,00	3,00	3,60	4,40	2,60	3,10	3,90	4,10	2,50	3,00	3,40	3,90	1,80	2,10	2,60	3,00	0,50	0,70	1,00	1,20						
	2	3,10	3,40	4,20	4,50	2,60	3,30	4,00	4,40	2,60	3,10	3,80	4,20	2,20	2,80	3,00	3,50	1,80	2,20	2,90	3,00	0,60	1,10	1,70	1,90						
	3	3,00	3,80	4,20	4,50	2,50	3,20	4,10	4,40	3,00	3,70	3,90	4,20	2,30	2,60	2,90	3,50	1,70	1,50	2,80	3,10	0,50	1,00	1,40	1,40						
promedio		2,97	3,57	4,10	4,47	2,37	3,17	3,90	4,40	2,73	3,30	3,87	4,17	2,33	2,80	3,10	3,63	1,77	1,93	2,77	3,03	0,53	0,93	1,37	1,50						
promedio General		3,78				3,46				3,52				2,97				2,38				1,08									
M6H4	1	1,70	2,40	2,90	3,80	1,30	2,10	3,70	4,10	1,50	2,00	3,50	4,00	1,20	1,70	2,80	3,10	1,10	1,80	3,10	3,70	1,20	1,70	2,70	3,40						
	2	3,10	4,00	4,30	4,30	1,50	2,00	3,70	4,00	1,60	2,20	3,70	4,20	1,60	1,90	2,30	3,00	1,20	2,10	3,30	3,60	1,90	2,50	3,70	3,90						
	3	1,70	2,00	2,50	2,70	1,40	1,70	3,90	4,20	2,30	2,90	3,70	4,30	1,80	2,00	3,00	3,60	1,30	1,50	3,40	3,80	1,70	2,40	3,20	3,80						
promedio		2,17	2,80	3,23	3,60	1,40	1,93	3,77	4,10	1,80	2,37	3,63	4,17	1,53	1,87	2,70	3,23	1,20	1,80	3,27	3,70	1,60	2,20	3,20	3,70						
promedio General		2,95				2,80				2,99				2,33				2,49				2,68									
M6H6	1	4,10	4,50	4,50	4,50	2,20	2,70	3,70	4,20	1,90	2,40	2,60	4,20	1,50	1,90	2,40	2,70	2,60	3,10	3,90	4,00	1,10	1,40	2,80	3,00						
	2	1,50	2,10	2,60	3,20	3,40	3,90	4,20	4,30	1,60	2,60	3,00	4,10	2,20	2,60	2,90	3,30	2,20	2,80	3,10	3,50	1,00	1,30	1,50	1,90						
	3	1,40	2,00	2,90	3,30	1,80	2,40	2,80	4,00	1,70	2,70	3,10	3,50	1,80	2,20	2,80	3,10	1,50	2,70	3,50	3,80	0,70	1,20	1,50	1,60						
promedio		2,33	2,87	3,33	3,67	2,47	3,00	3,57	4,17	1,73	2,57	2,90	3,93	1,83	2,23	2,70	3,03	2,10	2,87	3,50	3,77	0,93	1,30	1,93	2,17						
promedio General		3,05				3,3				2,78				2,45				3,058				1,58									



Anexo 10. Peso seco de los hongos aislados en medio de cultivo liquido con glifosato en las dosis (1g/l, 5g/l y 15g/l).

TESTIGO					ENSAYO		
HONGO	REPETICIONES	DOSIS			DOSIS		
		1ml	5ml	15ml	1ml	5ml	15ml
M6H1	1	0,0370	0,0160	0,0114	0,0111	0,0054	0,0090
	2	0,0526	0,0280	0,0327	0,0230	0,0100	0,0071
	3	0,0297	0,0111	0,0472	0,0203	0,0058	0,0122
PROMEDIO		0,0398	0,0184	0,0304	0,0181	0,0071	0,0094
M6H2	1	0,0342	0,0290	0,0217	0,0246	0,0047	0,0113
	2	0,0570	0,0332	0,0162	0,0052	0,0161	0,0045
	3	0,0608	0,0375	0,0207	0,0271	0,0053	0,0040
PROMEDIO		0,0507	0,0332	0,0195	0,0190	0,0087	0,0066
M6H4	1	0,0624	0,0321	0,0674	0,0400	0,0318	0,0499
	2	0,0359	0,0665	0,0702	0,0500	0,0408	0,0493
	3	0,0588	0,0397	0,0851	0,0248	0,0292	0,0225
PROMEDIO		0,0524	0,0461	0,0742	0,0383	0,0339	0,0406
M6H6	1	0,0542	0,0662	0,0896	0,0554	0,0421	0,0108
	2	0,0497	0,0547	0,0384	0,0374	0,0832	0,0248
	3	0,0376	0,0562	0,0763	0,0117	0,0458	0,0094
PROMEDIO		0,0472	0,0590	0,0681	0,0348	0,0570	0,0150
M8H1	1	0,0553	0,0221	0,0309	0,0738	0,0328	0,0080
	2	0,0510	0,0394	0,0355	0,0787	0,0005	0,0188
	3	0,0501	0,0595	0,0437	0,0488	0,0292	0,0092
PROMEDIO		0,0521	0,04	0,0367	0,07	0,0208	0,0120
M8H4	1	0,0462	0,0038	0,0647	0,0353	0,0103	0,0035
	2	0,0394	0,0199	0,0478	0,0655	0,0200	0,0055
	3	0,0362	0,0119	0,0295	0,0162	0,0117	0,0070
PROMEDIO		0,0406	0,0119	0,0473	0,0390	0,0140	0,0053



Anexo 11. Crecimiento radial de hongos en medio de cultivo solido con Cipermetrina en las dosis (1g/l, y 2g/l).

ENSAYO CON CIPERMETRINA																			
HONGO	REPETICIONES	TESTIGO										ENSAYO							
		DOSIS																	
		1g/l					2g/l					1g/l				2g/l			
		1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	1° dia	2° dia
M6H1	1	1,00	2,00	2,90	3,00	2,10	3,50	3,90	4,00	2,50	3,30	3,80	4,00	1,50	2,80	3,80	3,80	1,50	2,80
	2	1,30	1,60	3,10	3,50	1,70	2,30	3,70	4,00	1,70	2,50	3,60	3,70	2,30	3,00	3,90	3,90	2,30	3,00
	3	1,10	2,50	3,90	3,90	2,30	3,60	4,00	4,20	2,90	3,50	3,80	4,10	2,40	2,90	3,70	3,90	2,40	2,90
promedio		1,13	2,03	3,30	3,47	2,03	3,13	3,87	4,07	2,37	3,10	3,73	3,93	2,07	2,90	3,80	3,87	2,07	2,90
promedio General		2,48										3,16							
M6H2	1	3,20	3,60	3,90	4,20	2,60	3,20	3,90	4,40	2,40	2,90	3,20	3,60	2,60	3,00	3,60	4,10	2,60	3,00
	2	2,90	3,20	3,60	3,80	3,00	3,40	4,00	4,10	2,30	2,60	3,10	3,40	2,40	2,90	3,40	3,90	2,40	2,90
	3	3,10	3,70	3,90	4,20	2,90	3,50	4,00	4,30	2,00	2,50	2,90	3,10	2,20	2,80	3,30	3,80	2,20	2,80
promedio		3,07	3,50	3,80	4,07	2,83	3,37	3,97	4,27	2,23	2,67	3,07	3,37	2,40	2,90	3,43	3,93	2,40	2,90
promedio General		3,61										3,17							
M6H4	1	3,30	3,70	4,00	4,40	1,50	2,00	2,80	3,30	3,00	3,60	3,90	4,00	2,10	2,60	3,80	4,00	2,10	2,60
	2	3,40	3,70	4,00	4,20	1,80	2,40	2,90	3,50	2,50	3,60	4,00	4,30	1,80	2,10	2,90	3,10	1,80	2,10
	3	3,20	3,80	4,10	4,40	1,90	3,30	3,70	4,10	2,00	3,50	3,90	3,90	2,90	3,50	3,90	4,00	2,90	3,50
promedio		3,30	3,73	4,03	4,33	1,73	2,57	3,13	3,63	2,50	3,57	3,93	4,07	2,27	2,73	3,53	3,70	2,27	2,73
promedio General		3,85										3,06							
M6H6	1	3,00	3,30	3,90	4,00	1,60	2,40	0,80	3,90	2,00	2,90	3,70	3,80	1,90	2,40	3,70	3,80	1,90	2,40
	2	3,10	3,50	4,00	4,40	2,10	2,80	3,50	4,00	2,30	3,30	4,00	4,00	1,70	2,10	3,30	3,50	1,70	2,10
	3	3,00	3,40	3,80	4,20	1,90	2,40	2,00	3,80	2,60	2,90	3,90	4,00	2,30	3,00	3,60	3,70	2,30	3,00
promedio		3,03	3,40	3,90	4,20	1,87	2,53	2,10	3,90	2,30	3,03	3,87	3,93	1,97	2,50	3,53	3,67	1,97	2,50
promedio General		3,63										2,92							
M8H1	1	1,70	2,70	3,40	3,70	1,50	1,50	2,10	2,90	2,10	3,00	3,90	4,00	1,30	1,60	2,00	2,70	1,30	1,60
	2	1,30	2,90	3,10	3,30	2,10	2,30	3,80	3,90	1,70	2,40	2,70	2,90	1,80	2,50	3,70	3,90	1,80	2,50
	3	1,10	2,50	3,60	3,90	1,70	2,50	2,40	3,10	1,00	1,90	2,00	2,30	1,60	1,90	3,90	4,00	1,60	1,90
promedio		1,37	2,70	3,37	3,63	1,77	2,10	2,77	3,30	1,60	2,43	2,87	3,07	1,57	2,00	3,20	3,53	1,57	2,00
promedio General		2,77										2,58							
M8H4	1	2,10	3,10	4,00	4,20	2,00	2,50	3,00	3,50	2,00	3,20	3,90	3,90	1,40	2,10	2,60	2,90	1,40	2,10
	2	2,00	3,20	3,40	3,50	2,00	2,30	2,90	3,40	1,60	3,70	3,40	3,50	1,70	2,30	2,50	2,70	1,70	2,30
	3	1,90	3,20	3,30	2,90	2,00	2,10	3,10	3,60	1,70	2,10	2,60	2,80	1,60	1,80	2,10	2,30	1,60	1,80
promedio		2,00	3,17	3,57	3,53	2,00	2,30	3,00	3,50	1,77	3,00	3,30	3,40	1,57	2,07	2,40	2,63	1,57	2,07
promedio General		3,07										2,17							



Anexo 12. Peso seco de hongos aislados en medio de cultivo liquido con Cipermetrina en las dosis (1g/l, y 2g/l).

TESTIGO				ENSAYO	
HONGO	REPETICIONES	DOSIS		DOSIS	
		1g	2g	1g	2g
M6H1	1	0,0716	0,0625	0,0310	0,0579
	2	0,0568	0,0880	0,0641	0,0368
	3	0,0513	0,0888	0,0415	0,0277
PROMEDIO		0,0599	0,0798	0,0455	0,0408
M6H2	1	0,0192	0,0512	0,0163	0,0269
	2	0,0273	0,0766	0,0270	0,0422
	3	0,0385	0,0558	0,0288	0,0168
PROMEDIO		0,0283	0,0612	0,0240	0,0286
M6H4	1	0,1059	0,0795	0,0246	0,0468
	2	0,0972	0,0614	0,0270	0,0337
	3	0,0969	0,0401	0,0621	0,0252
PROMEDIO		0,1000	0,0603	0,0379	0,0352
M6H6	1	0,0444	0,0884	0,0602	0,0272
	2	0,1109	0,0588	0,0445	0,0253
	3	0,0814	0,0585	0,0558	0,0227
PROMEDIO		0,0789	0,0686	0,0535	0,0251
M8H1	1	0,0716	0,0930	0,0310	0,0309
	2	0,0568	0,0568	0,0641	0,0379
	3	0,0513	0,1363	0,0415	0,0179
PROMEDIO		0,0599	0,0954	0,0455	0,0289
M8H4	1	0,1310	0,0849	0,0263	0,0753
	2	0,0554	0,0906	0,0302	0,0189
	3	0,0714	0,0364	0,0254	0,0285
PROMEDIO		0,0859	0,0706	0,0273	0,0409



Anexo 13. Espectrofotometría de bacterias aisladas en medio de cultivo líquido con Glifosato en las dosis (1g/l, 5g/l y 15g/l).

ESPECTOFOTOMETRÍA					
N°	MUESTRA	0 mg ml ⁻¹ GI	1 mg ml ⁻¹ GI	5 mg ml ⁻¹ GI	15 mg ml ⁻¹ GI
1	M4B1	0,439	0,997	0,753	0,128
2	M4B1	0,205	0,668	0,891	1,035
3	M4B1	0,28	0,619	0,746	0,902
	X	0,308	0,76133333	0,79666667	0,68833333
1	M6B5	1,108	0,666	0,46	0,553
2	M6B5	0,879	0,822	0,494	0,545
3	M6B5	0,961	0,606	1,124	0,566
	X	0,98266667	0,698	0,69266667	0,55466667
1	M9.1 B3	1,123	0,738	1,117	0,534
2	M9.1 B3	1,461	1,205	1,042	0,819
3	M9.1 B3	1,579	1,073	0,898	1,549
	X	1,38766667	1,00533333	1,019	0,96733333

Anexo 14. Espectrofotometría de bacterias aisladas en medio de cultivo líquido con Cipermetrina en las dosis (1g/l, y 2g/l).

ENSAYO CON CIPERMETRINA					
TESTIGO				ENSAYO	
BACTERIA	REPETICIONES	DOSIS		DOSIS	
		1g	2g	1g	2g
M4B1	1	0,532	0,595	0,504	0,125
	2	0,820	0,786	0,153	0,076
	3	0,879	0,753	0,634	0,182
PROMEDIO		0,744	0,711	0,430	0,128
M6B5	1	0,722	0,611	0,514	1,094
	2	1,115	0,837	0,803	0,794
	3	0,713	0,759	0,516	0,354
PROMEDIO		0,850	0,736	0,611	0,747
M9.1B3	1	1,555	1,010	1,436	0,427
	2	1,666	1,359	1,430	0,808
	3	1,601	1,233	1,244	1,068
PROMEDIO		1,607	1,201	1,370	0,768